

1017-11 PCT
Immatics Biotechnologies GmbH

RECEPTORES DE LINFOCITOS T E INMUNOTERAPIAS BASADAS EN EL USO DE LOS MISMOS CONTRA CÁNCERES POSITIVOS PARA *PRAME*

La presente invención atañe a constructos reconocedores de antígenos asociados a tumor (TAA), en particular dirigidos contra el antígeno expresado diferencialmente en el melanoma (*PRAME*, por sus siglas en inglés). La invención proporciona en concreto moléculas basadas en un nuevo receptor de linfocitos T (TCR) que son selectivas y específicas hacia el antígeno expresado por tumores de la invención. El TCR de la invención, así como los fragmentos de unión al TAA que derivan del mismo, están destinados al uso en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de enfermedades tumorales que expresan TAA. Además, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los constructos reconocedores del antígeno de la invención, los vectores que comprenden esos ácidos nucleicos, las células recombinantes que expresan los constructos reconocedores de antígeno y las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención.

DESCRIPCIÓN

PRAME está codificado por el gen homónimo, que se expresa con profusión en un gran porcentaje de tumores, tales como los melanomas, carcinomas de pulmón amicrocítico, carcinoma ovárico, carcinoma de células renales (CCR), carcinoma de mama, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de colon, sarcoma, neuroblastoma, así como en diversos tipos de leucemia. *PRAME* es el miembro mejor caracterizado de la familia *PRAME* de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR). Los genomas de los mamíferos contienen varios miembros de la familia *PRAME*, mientras que en los genomas de otros vertebrados solo se ha identificado una proteína LRR similar a *PRAME*. *PRAME* es un antígeno de cáncer-testículo que se expresa muy poco en los tejidos adultos normales salvo en el testículo, pero sí lo hace con profusión en diversas células cancerosas.

Las dianas de la inmunoterapia basada en los linfocitos T están constituidas por epítomos peptídicos derivados de proteínas específicas de los tumores o asociadas a

los mismos, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos asociados a tumores (TAA, por sus siglas en inglés) pueden ser péptidos derivados de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, normalmente están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T a partir de células infiltradas en los tumores o de la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y la caracterización de los antígenos asociados a tumor y de los correspondientes receptores de linfocito T es importante para el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer como son vacunas y terapias celulares.

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos después por linfocitos T portadores de receptores de linfocito T (TCR) específicos. Por consiguiente, los TAA

son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T como, entre otras, las vacunas antitumorales y las terapias celulares.

Alrededor del 90 por ciento de los linfocitos T de la sangre periférica expresan TCR que constan de un polipéptido α y un polipéptido β . Un pequeño porcentaje de linfocitos T (alrededor del 5% del total) expresan un TCR constituido por un polipéptido γ y un polipéptido δ . Los linfocitos T $\gamma\delta$ abundan sobre todo en la mucosa intestinal, en el seno de una población de linfocitos conocidos como linfocitos intraepiteliales (IEL). A día de hoy aún se desconocen la mayoría de las moléculas antigénicas que activan a estos linfocitos T $\gamma\delta$. Con todo, dicho tipo de linfocitos no están restringidos por el MHC y parecen ser capaces de reconocer proteínas enteras en lugar de requerir la presentación de los péptidos unidos a moléculas del MHC por parte de las células presentadoras de antígeno, aunque algunos reconocen las moléculas MHC de tipo IB. Los linfocitos T humanos V γ 9/V δ 2, que constituyen la principal población de linfocitos T $\gamma\delta$ presente en la sangre periférica, son singulares porque responden con rapidez y especificidad a la presencia de un pequeño metabolito microbiano no peptídico, el HMB-PP, un precursor del pirofosfato de isopentenilo. Las estimaciones de los porcentajes de linfocitos T que se pueden hallar en la sangre periférica de donantes sanos son las siguientes: CD3+=70,78% $\pm$ 4,71; CD3+CD4+=38,97% $\pm$ 5,66; CD3+CD8+=28,955% $\pm$ 7,43; CD3+CD56+=5,22% $\pm$ 1,74; CD3-CD56+=10,305% $\pm$ 4,7; CD3+CD45RA+=45,00% $\pm$ 7,19; y CD3+CD45RO+=27,21% $\pm$ 7,34.

Las cadenas que conforman el receptor de antígenos del linfocito T que posee todo clon de dicha célula están compuestas por una combinación única de dominios, a saber: variable (V), [diversidad (D)], de unión (J; del inglés *Joining*) y constante (C). En cada clon de linfocito T, la combinación de los dominios V, D y J en la cadena alfa y en la cadena beta, o bien en las cadenas delta y gamma, participa en el reconocimiento del antígeno, de tal modo que constituye una característica única y exclusiva de ese clon concreto y define un sitio de unión único, también conocido como el idiotipo del clon de linfocito T. En cambio, el dominio C no participa en la unión al antígeno.

El TCR es una proteína heterodimérica ubicada en la superficie celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que está asociada con proteínas invariables del complejo CD3 que intervienen en la transducción de señales. Los TCR se dividen en las formas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que si bien son similares desde el punto de vista estructural son bastante distintas en su localización anatómica y, probablemente, en sus funciones. La fracción extracelular de los TCR heterodiméricos nativos $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ consta de dos polipéptidos, cada uno de los cuales posee un dominio constante en la parte más cercana a la membrana celular (proximal) y un dominio variable en el extremo más alejado de la misma (distal). Cada uno de los dominios constantes y variables alberga un puente disulfuro intracatenario. Los dominios variables contienen un bucle altamente polimórfico que es análogo a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) propias de los anticuerpos. El uso de la terapia génica con TCR permite solventar algunas trabas actuales. Permite dotar a los linfocitos T del propio paciente de las especificidades deseadas, así como generar el número suficiente de linfocitos T en un breve lapso de tiempo y evitar su agotamiento. El TCR se transduce en los linfocitos T potentes (p. ej. en los linfocitos T de la memoria central o en los dotados de características pluripotentes), con lo que puede obtenerse una mayor persistencia o mejor función tras la transferencia. Los linfocitos T provistos de los TCR genomodificados serán transferidos mediante una infusión a los pacientes oncológicos que han quedado inmunodeprimidos (linfopénicos) a causa de la quimioterapia o la radioterapia, posibilitando así un injerto eficiente y al mismo tiempo anulando la depresión inmunitaria.

Si bien ha habido avances en el desarrollo de agentes dirigidos contra dianas moleculares como tratamiento contra el cáncer, en este campo sigue existiendo la necesidad de nuevos agentes antitumorales que tengan como diana moléculas altamente específicas de las células cancerosas. La presente descripción aborda esa necesidad dando a conocer nuevos TCR del PRAME, los correspondientes constructos recombinantes de TCR, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras que se unen específicamente a uno o varios epítopos del TAA dados a conocer, así como métodos para usar tales moléculas en el tratamiento contra el cáncer. El término TAA en el contexto de la invención se refiere en particular a las siguientes proteínas preferidas: PRAME, y fragmentos o análogos de la misma, en particular fragmentos o análogos que comprenden o consisten en las secuencias

peptídicas antigénicas mostradas en las SEQ ID N.º 97 a 115, preferentemente en las SEQ ID N.º 97 a 106, más preferentemente la SEQ ID N.º 97.

El objeto de la invención se resuelve en un primer aspecto con un constructo reconocedor de antígenos que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) 3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferentemente del 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entra las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 129 y 135.

En ciertas formas de realización el constructo reconocedor de antígeno de la invención se une específicamente a un complejo formado por una molécula del HLA con el péptido del TAA, en el que dicho péptido comprende, o alternativamente consiste en, una variante del TAA que es homóloga al menos en un 66%, preferentemente al menos en un 77%, y más preferentemente aún al menos en un 88% (preferentemente al menos un 77% o al menos un 88% idéntica) a la secuencia de aminoácidos del TAA de la invención, en que dicha variante se une a una molécula del HLA de clase I o de clase II y/o induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dicho péptido no es el polipéptido originario entero.

Tal y como se emplean aquí, los términos «idénticos» o «identidad» porcentual, cuando se empleen en cualquier punto de la presente memoria en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de proteína/polipéptido, concierne a dos o más secuencias o subsecuencias que son idénticas o que tienen (o tienen como mínimo) un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o de nucleótidos idénticos (es decir, que guardan una identidad mínima de alrededor del 60%, preferentemente una identidad mínima del 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% o 94%, y más preferentemente aún por lo menos de alrededor del 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o una identidad mayor en una región especificada – preferentemente a lo largo de las secuencias enteras–, cuando se comparan y se alinean para su máxima correspondencia con la ventana de comparación o la región designada) cuando se miden con algoritmos de comparación de secuencias, o bien se someten a alineación manual y a inspección visual (véase, por ejemplo, la página

web de NCBI). En una forma de realización concreta, por ejemplo cuando se compara la secuencia proteínica o de ácidos nucleicos de un constructo reconocedor de antígeno de la invención con la de otra proteína o gen, la identidad porcentual se puede determinar mediante las búsquedas con el programa Blast sustentadas en la página web de NCBI; en concreto en lo referente a la identidad de los aminoácidos, por medio de BLASTP con los parámetros siguientes: Umbral esperado 10; Tamaño de palabra: 6; Matriz: BLOSUM62; Costes por hueco: Existencia: 11, Extensión: 1; Umbral de palabras aledañas: 11; Ajustes composicionales: ajuste condicional de la matriz de puntuación composicional.

En el contexto de la presente invención se entenderá que en cualesquiera formas de realización en las que se indique que «comprenden» ciertas características de la invención, se debe entender que incluyen algunas de las formas de realización más preferidas de la descripción más restringida de «consistente en» o «consistente básicamente en» las mismas características idénticas de la presente invención.

En otra forma de realización adicional o alternativa, el constructo reconocedor de antígenos puede comprender, además, una secuencia del dominio CDR1 y/o CDR2, o más preferentemente del CRD2bis. Dentro del dominio variable, la CDR1 y la CDR2 o la CDR2bis radican en la región variable (V) de la cadena polipeptídica, y la CDR3 abarca algunas de las regiones V y todas las regiones de diversidad (D) y de unión (J). La CDR3 es la más variable y es la principal CDR responsable de reconocer de manera específica y selectiva un antígeno. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR2bis se pueden seleccionar de una secuencia CDR de un alelo humano de la cadena variable.

Los TCR heterodiméricos alfa-beta nativos poseen una cadena alfa y una cadena beta. Cada cadena comprende sendas regiones constante, de unión y variable, a las que normalmente se suma en la cadena beta una región de diversidad corta intercalada entre la región de unión y la variable, si bien dicha región de diversidad se considera a menudo parte de la región de unión. Cada región variable comprende tres CDR (regiones determinantes de la complementariedad) intercaladas en una secuencia estructural, una de las cuales es la región hipervariable llamada CDR3. Existen varios tipos de regiones variables de la cadena alfa (V α) y varios tipos de

regiones variables de la cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su estructura, por las secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 parcialmente definida. En la nomenclatura IMGT, los tipos $V\alpha$ reciben un número único TRAV, mientras que los tipos $V\beta$ reciben un número único TRBV. Para más información sobre los anticuerpos inmunoglobulinas y los genes de los TCR véase el sistema de información internacional ImMunoGeneTics®, Lefranc M-P et al. (Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43(Database issue):D413-22; y <http://www.imgt.org/>).

Así pues, en una forma de realización adicional o alternativa el constructo reconocedor de antígenos de la invención comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 en una combinación como la presentada más adelante en la Tabla 1 de la presente memoria, que muestra el correspondiente alelo de la cadena variable junto con la secuencia de la CDR3. Así pues, se prefieren constructos reconocedores de antígenos de la invención que comprendan como mínimo una, pero preferentemente las cuatro secuencias de CDR, es decir, CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3. Preferentemente, un constructo reconocedor de antígeno de la invención comprende las respectivas CDR1, CDR2bis y CDR3 de una región variable del TCR de la invención dada a conocer en la presente memoria (véanse más adelante la Tabla 1 y el apartado de Ejemplos).

A efectos de la presente memoria, el término «especificidad» o «especificidad antigénica» o «específico para» un antígeno dado, significa que el constructo reconocedor de antígenos se puede unir específicamente a dicho antígeno, preferentemente un antígeno TAA, más preferentemente con una afinidad elevada, cuando dicho antígeno es presentado por moléculas del sistema HLA, preferentemente del alelo HLA-A2. Por ejemplo, se puede considerar que un TCR, en calidad de constructo reconocedor de antígenos, posee «especificidad antigénica» hacia los TAA, si los linfocitos T que expresan ese TCR entran en contacto con una molécula del HLA que presenta el TAA segregan como mínimo unos 200 pg/ml o más de interferón gamma ($IFN-\gamma$) (p. ej., 250 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 2000 pg/ml o más, 2500 pg/ml o más, 5000 pg/ml o más) tras su cultivo simultáneo con células diana estimuladas con una baja concentración de un antígeno TAA, como los antígenos y los epítomos de TAA proporcionados más adelante en la presente

memoria (p. ej., aprox. 10^{-11} mol/l, 10^{-10} mol/l, 10^{-9} mol/l, 10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l ó 10^{-5} mol/l). Otro criterio alternativo o adicional consiste en considerar un TCR como provisto de «especificidad antigénica» hacia el TAA, si los linfocitos T que expresan ese TCR segregan como mínimo dos veces más IFN- γ que el nivel de fondo de IFN- γ resultante del cultivo simultáneo de linfocitos no transducidos con células diana estimuladas con una baja concentración de antígenos TAA. Tal «especificidad» como la descrita se puede analizar, entre otros medios, con un ELISA.

En una forma de realización alternativa o adicional de la invención, el constructo reconocedor de antígenos se une selectivamente a un péptido antigénico derivado de TAA; preferiblemente el péptido antigénico derivado de TAA es un epítipo proteico o un péptido provisto de una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID N.º 97 a 115, más preferentemente la SEQ ID N.º 97, o una variante de la misma, consistiendo dicha variante en una delección, adición, inserción o sustitución de aminoácido de como máximo tres, preferentemente dos y más preferentemente aún un máximo de una posición de aminoácido.

El término «selectividad» o «reconocimiento y unión selectivas» se entiende que designa la facultad de un constructo reconocedor de antígenos, como un TCR o un anticuerpo, para reconocer selectivamente o unirse preferentemente a un único epítipo específico y que preferentemente muestra una reactividad cruzada nula o sustancialmente nula con otro epítipo. Preferentemente «selectividad» o «reconocimiento y unión selectivos» significa que el constructo reconocedor de antígenos (p. ej., un TCR) reconoce selectivamente o se une preferentemente a un único epítipo específico y preferentemente muestra una reactividad cruzada nula o sustancialmente nula con otro epítipo, en que dicho epítipo es único de una proteína, de tal modo que el constructo reconocedor de antígenos presenta una reactividad cruzada nula o sustancialmente nula con otro epítipo y otra proteína.

El constructo reconocedor de antígenos acorde con la invención se selecciona preferentemente de un anticuerpo, o un derivado o fragmento del mismo, o un receptor de linfocito T (TCR), o un derivado o fragmento del mismo. Un derivado o fragmento de anticuerpo o de TCR de la invención debe conservar preferentemente la capacidad para reconocer o unirse al antígeno de la molécula madre, en particular su

especificidad y/o selectividad como se han explicado antes. Esa funcionalidad de unión se puede conservar mediante la presencia de una región CDR3 tal y como se define en la presente memoria.

En una forma de realización de la invención, los TCR de la invención son capaces de reconocer los antígenos TAA que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. «Presentados por el MHC de clase I», tal y como se emplea en la presente memoria, significa que el TCR desencadena una respuesta inmunitaria tras su unión a los antígenos TAA que le son presentados por una molécula del MHC de clase I. La molécula MHC de clase I puede ser cualquier molécula MHC de clase I conocida en la técnica, p. ej., moléculas HLA-A. En una forma de realización preferida de la invención, la molécula MHC de clase I es una molécula del HLA-A2.

La invención proporciona tanto un constructo reconocedor de antígenos monocatenario como constructos reconocedores bicatenarios.

En una forma de realización, el dominio variable de cadena alfa del TCR presenta al menos una mutación con respecto al dominio de cadena alfa del TCR mostrado en la Tabla 1; y/o el dominio variable de cadena beta del TCR tiene como mínimo una mutación con respecto al dominio de cadena alfa del TCR mostrado en la Tabla 1. En una forma de realización, un TCR que comprende al menos una mutación en el dominio variable de cadena alfa del TCR y/o del dominio variable de cadena beta del TCR está provisto de afinidad de unión a, y/o de una semivida de unión con un complejo formado por el péptido de TAA-molécula HLA, que como mínimo duplica la del TCR que comprende un dominio variable de cadena alfa no mutado y/o un dominio variable de cadena beta no mutado.

Las cadenas alfa de TCR de la presente descripción pueden, además, comprender un dominio transmembrana de cadena alfa y/o un dominio intracelular de cadena alfa. Las cadenas beta de TCR de la presente descripción pueden, además, comprender un dominio transmembrana de cadena beta y/o un dominio intracelular de cadena beta.

La invención proporciona en concreto un TCR como constructo reconocedor de antígenos, o un fragmento o derivado del mismo. El TCR es preferentemente de origen humano, por lo cual se entiende como generado a partir de un locus de un TCR humano y que, por consiguiente, comprende secuencias de TCR humanas. Además, el TCR de la invención se puede caracterizar porque es de origen humano y reconoce específicamente un antígeno TAA de la invención.

Otra forma de realización de la invención proporciona de forma adicional o alternativa el constructo reconocedor de antígeno antes descrito, que estimula una respuesta inmunitaria, y preferentemente dicha respuesta inmunitaria se caracteriza por un incremento de los niveles de interferón gamma (IFN- γ).

Los TCR de la invención se pueden proporcionar en forma de moléculas monocatenarias α o β , o γ y δ , o alternativamente como constructos bicatenarios compuestos por una cadena α y otra β , o por una cadena γ y otra δ .

El constructo reconocedor de antígeno de la invención puede comprender una cadena α o γ de TCR; y/o una cadena β o δ de TCR; en el que la cadena α o γ del TCR comprende una CDR3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o el 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 3, 15, 27, 39, 51, 63, 75 y 129, y/o en el que la cadena β o δ del TCR comprende una CDR3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 9, 21, 33, 45, 57, 69, 81 y 135.

Lo más preferente, en algunas formas de realización adicionales, en que la descripción se refiere a constructos reconocedores de antígeno que comprenden una cualquiera, dos, tres o todas las regiones CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 de las cadenas de TCR descritas en la presente memoria (véase la Tabla 1), es que se puedan preferir constructos reconocedores de antígeno que comprendan la respectiva secuencia de la CDR de la invención provista de tres, dos, y preferentemente un único residuo de aminoácido modificado. El residuo de aminoácido modificado se puede seleccionar entre los siguientes supuestos: una inserción, una delección o una

sustitución de aminoácido. Lo más preferible es que los tres, los dos, o preferentemente el único residuo de aminoácido modificado sea el primero o el último residuo de aminoácido de la secuencia de la CDR respectiva. Si la modificación consiste en una sustitución, entonces en ciertas formas de realización es preferible que sea una sustitución de aminoácido conservadora.

Si el constructo reconocedor de antígeno de la invención está compuesto por al menos dos cadenas de aminoácidos, como un TCR bicatenario, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, el constructo reconocedor de antígeno puede comprender en su primera cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 3, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 9; o en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 15, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 21; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 27, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 33; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 39, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 45; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 51, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 57; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 63, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 69; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 75, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 81; o bien en su primera cadena polipeptídica una secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 129, y en su segunda cadena polipeptídica la secuencia de aminoácidos conforme a la SEQ ID N.º 135. Cualquiera de los susodichos TCR bicatenarios, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son los TCR preferidos de la presente invención. En ciertas formas de realización, la CDR3 del TCR bicatenario de la invención puede estar mutada. Las mutaciones de las secuencias de CDR3 como las proporcionadas antes incluyen preferentemente una sustitución, delección, adición o inserción de un máximo de tres, preferentemente dos, y lo más preferible como máximo un solo residuo de aminoácido.

En algunas formas de realización, la primera cadena polipeptídica puede ser una cadena α o γ de TCR, y la segunda cadena polipeptídica puede ser una cadena β o δ de TCR. Se prefiere la combinación de un TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

El TCR, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, está compuesto en ciertas formas de realización por una cadena α de TCR y otra cadena β de TCR, o bien por una cadena γ y otra δ . Ese TCR bicatenario comprende regiones variables en cada una de sus cadenas, y tales regiones variables comprenden a su vez una secuencia CDR1, otra CDR2, o más preferentemente una CDR2bis y otra CDR3. Los TCR comprenden las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 como las comprendidas en la secuencia de aminoácidos de la cadena variable de la SEQ ID N.º 4 y 10, o 16 y 22; o 28 y 34; o 40 y 46; o 52 y 58; o 64 y 70; o 76 y 82; o 130 y 136.

Ciertas formas de realización de la invención se refieren a un TCR, o a un fragmento del mismo, compuesto por una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en que dicho TCR comprende la región variable provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferentemente del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las cadenas α y β conformes a las SEQ ID N.º 4 y 10 respectivamente, o 16 y 22, o 28 y 34, o 40 y 46, o 52 y 58, o 64 y 70, o 76 y 82, o 130 y 136 .

En una forma de realización preferida, la presente invención proporciona un TCR mejorado, designado como R11P3D3_KE, compuesto de una cadena α de TCR y de una cadena β de TCR, en que dicho TCR comprende secuencias de la región variable provistas de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada de la cadenas α y β acordes con las SEQ ID N.º 132 y 138. Este TCR mostró una sorprendente funcionalidad mejorada a la hora de reconocer las células tumorales en comparación con su receptor original, el cual se designa en la presente memoria como R11P3D3.

Los TCR de la invención pueden comprender, además, una región constante derivada de cualquier especie adecuada, como es cualquier mamífero, p. ej., ser humano, rata, mono, conejo, asno o ratón. En una forma de realización de la invención, los TCR de

la invención comprenden, además, una región constante humana. En ciertas formas de realización preferidas, la región constante del TCR de la invención puede ser levemente modificada, por ejemplo, con la introducción de secuencias heterólogas, preferentemente de secuencias de ratón, que pueden incrementar la estabilidad y la expresión del TCR. En ciertas formas de realización preferidas, la región variable del TCR de la invención puede ser ligeramente modificada, por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones puntuales únicas con el fin de optimizar la estabilidad del TCR y/o de reforzar el emparejamiento de las cadenas que lo conforman.

Ciertas formas de realización de la invención se refieren a un TCR, o a un fragmento del mismo, compuesto por una cadena α de TCR y una cadena β de TCR, en que dicho TCR comprende la región constante provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o preferentemente del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las cadenas α y β conformes a las SEQ ID N.º 5 y 11; o 17 y 23; o 29 y 35; o 41 y 47; o 53 y 59; o 65 y 71; o 77 y 83; o 131 y 137.

La cadena α o γ del TCR de la invención puede comprender, además, una CDR1 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 1, 13, 25, 37, 49, 61, 73 y 127, y/o una CDR2 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 2, 14, 26, 38, 50, 62, 74 y 128; y/o más preferentemente una CDR2bis provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202 y 204.

La cadena β o δ del TCR de la invención puede comprender, además, una CDR1 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 7, 19, 31, 43, 55, 67, 79 y 133, y/o una CDR2 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las

SEQ ID N.º 8, 20, 32, 44, 56, 68, 80 y 134, y/o una CDR2bis provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 8, 20, 32, 44, 56, 68, 80 y 134.

En otra forma de realización, el constructo reconocedor de antígeno puede comprender un fragmento de unión de un TCR, en el que dicho fragmento de unión comprende en una cadena las CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3, opcionalmente seleccionadas entre las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1, 2, 3, 196; ó 7, 8, 9; ó 13, 14, 15, 197; ó 19, 20, 21; ó 25, 26, 27, 198; ó 31, 32, 33; ó 37, 38, 39, 199; ó 43, 44, 45; ó 49, 50, 51, 200; ó 55, 56, 57; ó 61, 62, 63, 201; ó 67, 68, 69; ó 73, 74, 75, 202; ó 79, 80, 81; ó 127, 128, 129, 204; o 133, 134, 135.

En otras formas de realización de la invención, el constructo reconocedor de antígeno que ha sido descrito antes en la presente memoria es un TCR, o un fragmento del mismo, compuesto por al menos una secuencia de la cadena α de TCR y una secuencia de cadena β de TCR, en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1 a 3 y 196, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 7 a 9; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 13 a 15 y 197, y dicha secuencia de cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 19 a 21; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 25 a 27 y 198, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 31 a 33; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 37 a 39 y 199, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 43 a 45; o en que dicha

secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 49 a 51 y 200, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 55 a 57; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 61 a 63 y 201, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 67 a 69; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 73 a 75 y 202, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 79 a 81; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 127 a 129 y 204, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 133 a 135.

En otras formas de realización de la invención, el constructo reconocedor de antígeno que ha sido descrito antes en la presente memoria es un TCR, o un fragmento del mismo, que comprende al menos una secuencia de la cadena α de TCR y una secuencia de cadena β de TCR, en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 4, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 10; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 16, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 22; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 28, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 34; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 40, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia

de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 46; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 52, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 58; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 70; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 76, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 82; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 130, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 136.

En otras formas de realización de la invención el constructo reconocedor de antígeno que ha sido descrito antes en la presente memoria es un TCR, o un fragmento del mismo, que además comprende una región constante de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 131 y 137, preferentemente en que el TCR está compuesto de al menos una secuencia de cadena α de TCR y de una secuencia de cadena β de TCR, en que la secuencia de dicha cadena α de TCR comprende una región constante provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 5, 17, 29, 41, 53, 65, 77 y 131; y en que la secuencia de cadena β de TCR comprende una región constante provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 11, 23, 35, 47, 59, 71, 83 y 137.

Se dan a conocer asimismo constructos reconocedores de antígenos como los descritos antes en la presente memoria que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 6, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 12. La invención también proporciona TCR que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 18, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 24. En otras formas de realización la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 30, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 36. En otras formas de realización la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 42, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 48. En otras formas de realización la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 54, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 60. En otras formas de realización, la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de

secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 66, y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 72. En otras formas de realización la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 78 y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 84. En otras formas de realización la invención proporciona constructos reconocedores de antígeno que son TCR y que comprenden una primera cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 132 y de una segunda cadena de TCR provista de una identidad de secuencia de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 138.

A efectos de la presente memoria, el término «murino» o «humano», cuando se refiere a un constructo reconocedor de antígeno, o a un TCR, o a cualquier componente de un TCR descrito en la presente memoria (p. ej., región determinante de la complementariedad (CDR), región variable, región constante, cadena α y/o cadena β), designa un TCR o un componente del mismo, que procede de un locus de TCR de ratón o de ser humano sin reorganizar, respectivamente.

En una forma de realización de la invención se proporcionan TCR quiméricos, cuyas cadenas de TCR comprenden secuencias procedentes de varias especies. Preferentemente, un TCR de la invención puede comprender una cadena α que comprende una región variable humana procedente de una cadena α y, por ejemplo, una región constante murina procedente de una cadena α de TCR murino.

En una forma de realización, el TCR de la invención es un TCR humano que comprende regiones variables humanas acordes con las susodichas formas de realización, así como regiones constantes humanas.

En ciertas formas de realización el constructo reconocedor de antígeno está murinizado o humanizado. Estos términos se emplean cuando se introducen secuencias de aminoácidos procedentes de otras especies en el constructo de la invención.

El TCR de la invención se puede proporcionar en forma de TCR monocatenario (TCRmc). Un TCRmc acorde con la invención debe comprender una cadena polipeptídica, una secuencia de cadena alfa parcial o entera y una secuencia de cadena beta parcial o entera, preferentemente conectadas a través de un péptido de enlace. Un TCRmc puede comprender un polipéptido procedente de una región variable de una primera cadena de TCR (p. ej., una cadena alfa) y un polipéptido procedente de una segunda cadena TCR entera (íntegra) (p. ej., una cadena beta), o viceversa. Asimismo, el TCRmc puede comprender opcionalmente uno o más conectores que unan los dos o más polipéptidos entre sí. El conector puede ser, por ejemplo, un péptido, que una entre sí dos cadenas sencillas, tal y como describe la presente memoria. También se puede proporcionar un TCRmc de la invención que esté fusionado con una citocina humana, como por ejemplo la IL-2, la IL-7 o la IL-15.

El constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención también se puede proporcionar con la forma de un complejo multimérico, que comprenda como mínimo dos moléculas TCRmc, donde cada una de esas moléculas de TCRmc estén fusionadas con al menos una biotina, u otra molécula de interconexión o conector, y en que dichas TCRmc estén interconectadas por la interacción entre la biotina y la estreptoavidina con el fin de formar dicho complejo multimérico. La creación de TCR multiméricos también es posible con otras estrategias similares conocidas en la disciplina que figuran incluidas en la presente memoria. Asimismo, se proporcionan complejos multiméricos de orden superior, que comprenden más de dos TCRmc de la invención.

A efectos de la presente invención, un TCR es una fracción provista de al menos un dominio variable de cadena alfa o beta del TCR y/o de cadena beta o delta del TCR. En términos generales, comprende tanto un dominio variable de la cadena alfa del TCR como un dominio variable de la cadena beta del TCR, o alternativamente un dominio variable de la cadena gamma del TCR como un dominio variable de la cadena delta del TCR. Pueden ser heterodímeros $\alpha\beta/\gamma\delta$ o pueden tener un formato monocatenario. Para el uso en la terapia adoptiva, un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ podría, por ejemplo, ser transfectado en forma de cadenas enteras provistas tanto de dominios citoplasmáticos como transmembrana. Si conviniese, podría incorporarse un puente disulfuro entre residuos de los respectivos dominios constantes.

En una forma de realización preferida, el constructo reconocedor de antígeno es un TCR humano, o un fragmento o derivado del mismo. Un TCR humano o un fragmento o derivado del mismo es un TCR que comprende más del 50% de la secuencia de TCR humana correspondiente. Preferentemente, solo una pequeña parte de la secuencia del TCR es de origen artificial o deriva de otras especies. Sin embargo, es sabido que los TCR quiméricos, p. ej., aquellos que siendo de origen humano incorporan secuencias murinas en los dominios constantes, resultan ventajosos. Así pues, se prefieren especialmente los TCR acordes con la presente invención que contengan secuencias murinas en la parte extracelular de sus dominios constantes.

También se prefiere que el constructo reconocedor de antígeno de la invención sea capaz de reconocer su antígeno a través del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), preferiblemente presentados a través del alelo HLA-A*02. El término «presentado por (o a través de) el sistema HLA» en el contexto de la presente invención significa que el constructo reconocedor de antígeno se une al antígeno solo en el caso de que el péptido antigénico sea presentado por dicho HLA.

El constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención induce en una forma de realización preferida una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria que se caracteriza por el incremento de los niveles de interferón gamma (IFN- γ).

La invención también proporciona un polipéptido que comprende una fracción funcional de cualquiera de los TCR (o de variantes funcionales del mismo) descritos en la presente memoria, por ejemplo, de cualquiera de los TCR seleccionados de R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3, R17P2B6 y R11P3D3_KE, que aparecen en el apartado de Ejemplos y en la Tabla 1. El término «polipéptido» tal y como se emplea en la presente memoria incluye oligopéptidos y se refiere a una monocadena de aminoácidos conectados por uno o más enlaces peptídicos. Con respecto a los polipéptidos de la invención, la fracción funcional puede ser cualquier fracción que comprenda aminoácidos contiguos del TCR (o de una variante funcional del mismo), del cual forma parte, siempre que la fracción funcional se una específicamente a un antígeno TAA, preferentemente tal y como se indica en la Tabla 2 de la presente memoria, y a los péptidos A1 a A9 (SEQ ID N.º 97 y 98-106, y los péptidos T₁ a T₉ (SEQ ID N.º 107-115). El término «fracción funcional» cuando se usa en referencia a un TCR (o a una variante funcional del mismo) se refiere a cualquier parte o fragmento del TCR de la invención (o de una variante funcional del mismo) que conserva la actividad biológica del TCR (o de una variante funcional del mismo) y que forma parte del mismo (del TCR original o de la variante funcional original del mismo). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un TCR (o de una variante funcional del mismo) que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno TAA (presentado por el HLA), o de detectar, tratar o prevenir un cáncer, en un grado parecido, igual o superior al del TCR original (o al de una variante funcional del mismo). En referencia al TCR original (o a una variante funcional del mismo), la fracción funcional puede comprender, por ejemplo, alrededor de un 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más de las secuencias variables del TCR original (o de una variante funcional del mismo).

La fracción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi-terminal de la fracción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se hallan en la secuencia de aminoácidos propia del TCR original o de la variante funcional del mismo. Es conveniente que esos aminoácidos adicionales no interfieran en la función biológica de la fracción funcional, p. ej., su unión específica a los antígenos TAA y/o en la capacidad para detectar, tratar o prevenir el cáncer, etc. Aún más conveniente es que los aminoácidos adicionales potencien la actividad biológica,

en comparación con la actividad biológica del TCR original o de la variante funcional del mismo.

El polipéptido puede comprender una fracción funcional derivada de una o de ambas cadenas α y β de los TCR de la invención o de las variantes funcionales de los mismos, de tal forma que la fracción funcional comprenda una o más de las CDR1, CDR2, CDR2bis y (preferentemente) CDR3 de la región o regiones variables de la cadena α y/o la cadena β de un TCR de la invención o de una variante funcional del mismo. En una forma de realización de la invención, el polipéptido puede comprender una fracción funcional que comprenda la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 129 y 135 (CDR3 de las regiones variables del TCR de la invención), o una combinación de las mismas. En una forma de realización de la invención, el polipéptido de la invención puede comprender, por ejemplo, la región variable del TCR de la invención o de una variante funcional del mismo que contenga una combinación de las regiones CDR indicadas arriba. A este respecto, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID N.º 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 130 y 136 (las regiones variables de una cadena α o β del TCR de la invención).

En ciertos casos, el constructo de la invención puede comprender una o dos cadenas polipeptídicas que contengan una secuencia conforme con cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a 84 y 127 a 138 y 196 a 202 y 204 (secuencias CDR, regiones variables y constantes, y secuencias enteras), o fragmentos funcionales de las mismas, y además contener otras secuencias de aminoácidos, como, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que codifique una inmunoglobulina o una fracción de la misma, en cuyo caso la proteína de la invención puede ser una proteína de fusión. A este respecto, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente memoria junto con al menos otro polipéptido más. El otro polipéptido puede concurrir como un polipéptido separado de la proteína de fusión, o puede hacerlo como un polipéptido que se exprese en tándem junto con uno de los polipéptidos de la invención descritos en la presente memoria. El otro polipéptido puede incluir cualquier molécula peptídica o proteinácea, o una fracción de la misma, que incluya sin limitación, una

inmunoglobulina, CD3, CD4, CD8, una molécula del MHC, una molécula CD1, p. ej., CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, etc.

La proteína de fusión puede comprender una o más copias del polipéptido de la invención y/o una o más copias del otro polipéptido. Por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más copias del polipéptido de la invención y/o del otro polipéptido. Los métodos adecuados para fabricar proteínas de fusión son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, métodos recombinantes. En ciertas formas de realización de la invención, los TCR (y las fracciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos), los polipéptidos, y las proteínas de la invención se pueden expresar como una sola proteína que comprenda un péptido conector que conecte la cadena α con la cadena β , y conecte la cadena γ con la cadena δ . A este respecto, los TCR (y las variantes funcionales y las fracciones funcionales de los mismos), los polipéptidos y las proteínas de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del TCR de la invención y pueden comprender además un péptido conector. El péptido conector puede facilitar ventajosamente la expresión de un TCR recombinante (incluidas las fracciones funcionales y las variantes funcionales del mismo), un polipéptido y/o una proteína en una célula hospedadora. El péptido conector puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. Las secuencias de conexión para los constructos de TCR monocatenarios son bien conocidas en la técnica. Tal constructo monocatenario puede comprender, además, una o dos secuencias de dominio constante. Una vez que la célula hospedadora exprese el constructo provisto de péptido conector, el péptido conector puede ser escindido, lo que dará como resultado la separación de las cadenas α y β o de las cadenas γ y δ .

Como ya se ha mencionado antes, la funcionalidad de unión del TCR de la invención se puede proporcionar incorporada en la estructura de un anticuerpo. Por ejemplo, las secuencias CDR del TCR de la invención, posiblemente incluyendo 3, 2 o 1 residuos estructurales adicionales en los extremos N-terminal y/o C-terminal, pueden ser insertadas directamente en una secuencia variable de cadena ligera o pesada de anticuerpo. El término «anticuerpo» en sus diversas formas gramaticales se usa en la presente memoria para referirse a moléculas de inmunoglobulina y a fracciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas

que contienen un sitio de unión a antígeno o un paratopo. Tales moléculas también se denominan «fragmentos de unión con el antígeno» de las moléculas de inmunoglobulina. La invención proporciona además un anticuerpo, o una fracción de unión con el antígeno del mismo, que se une específicamente a los antígenos descritos en la presente memoria. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que sea conocida en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. Y además puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo natural, p. ej., un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, como, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo genéticamente modificado, como por ejemplo un anticuerpo humanizado o uno quimérico. El anticuerpo puede aparecer en forma monomérica o polimérica.

El término «anticuerpo» incluye, sin limitación, formas modificadas genéticamente o modificadas de cualquier otro modo de inmunoglobulinas, tales como anticuerpos intracelulares, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados (p. ej., creados con el «injerto de CDR»), fragmentos de anticuerpo y anticuerpos heteroconjugados (p. ej., anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, etc.). El término «anticuerpo» incluye cis-diacuerpos y minicuerpos. Así pues, todas y cada una de las formas de realización proporcionadas en la presente memoria donde se haga referencia a «anticuerpos» o a «constructos similares a anticuerpos» también abarcan formas de realización con anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, fragmentos scFv, constructos con receptor de anticuerpo quimérico (CAR), diacuerpo y/o minicuerpo, a menos que se indique explícitamente otra cosa. El término «anticuerpo» incluye un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas o un polipéptido que comprende fragmentos de una inmunoglobulina que es capaz de unirse de forma no covalente, reversible y específica a un antígeno pertinente, preferentemente el TAA de la invención, tal y como se da a conocer en la presente memoria. A título de ejemplo, una unidad estructural de anticuerpo comprende un tetrámero. En ciertas formas de realización, un anticuerpo entero puede estar compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en las que cada uno de esos pares está compuesto por una cadena «ligera» y otra «pesada» (unidas por un puente disulfuro). La estructura de los anticuerpos y los

isotipos son bien conocidas por las personas versadas en la materia (consúltese por ejemplo Janeway's Immunobiology, 9.^a edición, 2016).

Los genes de las inmunoglobulinas reconocidos en los mamíferos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la infinidad de genes de la región variable de la inmunoglobulina (para más información sobre los genes de la inmunoglobulina véase el Sistema de información internacional ImMunoGeneTics®, Lefranc M-P et al, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D413-22; y <http://www.imgt.org/>). En las cadenas enteras, las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. En las cadenas enteras, las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta y épsilon, que a su vez definen las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos que es la principal responsable del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable designan esas regiones en las cadenas ligera y pesada. Tal y como se emplea en la presente invención, un «anticuerpo» abarca todas las variaciones del anticuerpo y de los fragmentos del mismo. Así pues, dentro del ámbito de este concepto quedan englobados los anticuerpos enteros, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios (scFv), Fab, Fab' y las versiones multiméricas de tales fragmentos (p. ej., F(ab')₂) con una especificidad de unión idéntica, básicamente idéntica o similar. En ciertas formas de realización, el anticuerpo se une específicamente a un péptido del TAA de la invención. Los constructos reconocedores de antígenos preferidos de acuerdo con la invención incluyen una cadena pesada de anticuerpo, preferentemente el dominio variable de la misma, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, y/o una cadena ligera de anticuerpo, preferentemente el dominio variable de la misma, o un fragmento de unión al antígeno de la misma. De forma similar, es posible preparar fragmentos de región variable estabilizados con puentes disulfuro (dsFv) mediante técnicas de ADN recombinante que sirvan como fragmentos de anticuerpo de la invención; no obstante, los tipos de fragmentos de anticuerpo no se limitan a los citados, que se muestran a título de ejemplo. Asimismo, el anticuerpo, o la fracción de unión al antígeno del mismo, puede ser modificado para que contenga un marcador detectable, como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante), y

partículas de elementos (p. ej., partículas de oro). En ciertos casos, la secuencia de la CDR3 del TCR puede ser ligeramente modificada, pero es preferible que lo sea como máximo en 3 residuos de aminoácidos, preferentemente solo en dos y, más preferentemente aún, en una sola posición de aminoácido, con respecto a las secuencias de la CDR3 expuestas en las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 129 y 135. Preferentemente, los anticuerpos comprenden la CDR3, preferentemente todas las regiones CDR1, CDR2, CDR2bis y CDR3 en la combinación, tal y como se indica para el TCR de la invención en la Tabla 1, en cada caso independientemente, y opcionalmente con un máximo de tres, o dos, o preferentemente una sustitución, inserción o delección de aminoácido en comparación con tales secuencias.

Los métodos adecuados para fabricar anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, métodos ordinarios para la creación de hibridomas se describen en Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol, 5, 51 1-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y en C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011)), entre otras fuentes. Además, se describen métodos para producir anticuerpos en animales en las patentes de EE. UU. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, así como en la publicación de solicitud de patente en EE. UU. N.º 2002/0197266, entre otras referencias.

Ciertas formas de realización de la invención también conciernen a TCR, o a fragmentos funcionales y polipéptidos de los mismos, que son TCR solubles. A efectos de la presente memoria, el término «receptor de linfocito T soluble» se refiere a variantes truncadas heterodiméricas de TCR nativos, que comprenden fracciones extracelulares de la cadena α y de la cadena β del TCR que, por ejemplo, permanecen unidas por un puente disulfuro, pero que carecen de los dominios transmembrana y citosólico de la proteína nativa. Los términos «secuencia de la cadena α del receptor de linfocito T soluble» y «secuencia de la cadena β del receptor de linfocito T soluble» se refieren a secuencias de las cadenas α y β del TCR que carecen de los dominios transmembrana y citosólico. La secuencia (de aminoácidos o de ácidos nucleicos) de las cadenas α y β del TCR soluble pueden ser idénticas a las secuencias correspondientes de un TCR nativo o pueden comprender secuencias de las cadenas α y β del TCR soluble que sean variantes, en comparación con las secuencias del

correspondiente TCR nativo. A efectos de la presente memoria, el término «receptor de linfocito T soluble» abarca los TCR solubles provistos de secuencias variantes y no variantes de las cadenas α y β de TCR soluble. Las variaciones pueden radicar en las regiones variables o constantes de las secuencias de las cadenas α y β de TCR soluble y pueden incluir, sin ánimo de limitación, mutaciones por delección, inserción o sustitución de aminoácidos, así como cambios en la secuencia de ácidos nucleicos que no alteren la secuencia de aminoácidos. Los TCR solubles de la invención conservarán en cualquier caso la funcionalidad de unión de las moléculas originales de las cuales deriven.

El susodicho problema se resuelve además mediante un ácido nucleico que codifique un constructo reconocedor de antígeno de la invención, o cualquiera de los susodichos constructos proteicos o polipeptídicos. El ácido nucleico tendrá preferentemente: (a) una hebra que codifique un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención; (b) una hebra complementaria de la hebra (a); o (c) una hebra que se hibride en condiciones rigurosas (restrictivas) con una molécula descrita en (a) o (b). Las condiciones rigurosas son conocidas por las personas versadas en la materia, concretamente se pueden consultar en Sambrook et al, "Molecular Cloning". Además de lo anterior, el ácido nucleico puede contener opcionalmente otras secuencias que sean necesarias para expresar la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente a la proteína, específicamente para su expresión en una célula de mamífero o humana. El ácido nucleico usado puede estar contenido en un vector adecuado para posibilitar la expresión en la célula en cuestión de la secuencia de ácido nucleico correspondiente al péptido. No obstante, los ácidos nucleicos también se pueden usar para transformar una célula presentadora de antígeno, que podría no ser una célula presentadora de antígeno clásica, como son las células dendríticas, de tal modo que ella misma produjera las proteínas correspondientes en su superficie celular.

En ciertas formas de realización, los polipéptidos de los constructos reconocedores de antígeno pueden ser codificados por ácidos nucleicos y expresados en condiciones *in vivo* o *in vitro*. Así pues, en ciertas formas de realización, se proporciona un ácido nucleico que codifica un constructo reconocedor de antígeno. En ciertas formas de realización, el ácido nucleico codifica una parte o un monómero de un constructo reconocedor de antígeno de la invención (por ejemplo, una de las dos cadenas de un

TCR de la invención), y/u otro ácido nucleico codifica otra parte o un monómero de un constructo reconocedor de antígeno de la invención (por ejemplo, la otra de las dos cadenas del TCR). En ciertas formas de realización, el ácido nucleico codifica dos o más cadenas polipeptídicas del constructo reconocedor de antígeno, por ejemplo, como mínimo 2 cadenas del TCR. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas del constructo reconocedor de antígeno pueden incluir sitios de escisión para el ácido nucleico entre al menos dos secuencias de cadena, pueden codificar un sitio de inicio de la transcripción o de la traducción entre dos o más secuencias de cadena, y/o codificar sitios diana para proteólisis entre dos o más cadenas del constructo reconocedor de antígeno.

A efectos de la presente memoria, «ácido nucleico» incluye «polinucleótido», «oligonucleótido» y «molécula de ácido nucleico», y en general designa un polímero de ADN o de ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (p. ej., aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y puede contener un enlace entre nucleótidos naturales, no naturales o alterados, como un enlace fosforamidato o fosforotioato, en lugar del enlace fosfodiéster que se halla entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado.

Preferentemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. A efectos de la presente memoria, el término «recombinante» se refiere a: (I) moléculas que son construidas fuera de las células vivas mediante la unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos con moléculas de ácidos nucleicos que se pueden replicar en una célula viva; o (II) moléculas que son el resultado de la replicación de las descritas en el precedente punto (I). A efectos de la presente memoria, la replicación puede ser una replicación en condiciones *in vitro* o en condiciones *in vivo*. El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifique cualquiera de los TCR, polipéptidos o proteínas, o fracciones funcionales o variantes funcionales de los mismos que se describen en la presente memoria.

Además, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico acorde con la invención tal y como se ha descrito antes. Es conveniente que el vector sea un vector de expresión o un vector de expresión recombinante. En el contexto de la

presente invención, el término «vector de expresión recombinante» se refiere a un constructo de ácido nucleico que posibilita la expresión de un ARNm, una proteína o un polipéptido en el seno de una célula hospedadora adecuada. El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante, y se puede usar para transformar o transfectar cualquier hospedador adecuado. Los vectores aptos incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o bien para ambas, tales como plásmidos y virus. Ejemplos de vectores de expresión en animales son pEUK-CI, pMAM y pMAMneo. Preferentemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral. El vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicas para cada tipo de célula hospedadora (p. ej., bacteria, hongo, planta o animal), en la cual se va a introducir el vector con el propósito de que tenga lugar la expresión del ácido nucleico de la invención. Asimismo, el vector de la invención puede incluir uno o varios genes marcadores, que permitan la selección de las células hospedadoras transformadas o transfectadas. El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor normativo o nativo enlazado funcionalmente con la secuencia de nucleótidos que codifica los constructos de la invención, o con la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica los constructos de la invención. Los promotores susceptibles de selección incluyen, entre otros tipos, promotores específicos del desarrollo o de tejido, inducibles, débiles o potentes. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden ser diseñados para generar una expresión transitoria o una expresión estable, o ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden diseñar para generar una expresión constitutiva o bien inducible.

La invención también atañe a una célula hospedadora que comprende un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención. En concreto, la célula hospedadora de la invención comprende un ácido nucleico, o un vector como el descrito antes en la presente memoria. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, fúngica o algal, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacteriana o protozoaria. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, como

por ejemplo un ser humano. La célula hospedadora puede ser una célula adherida o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. A los efectos de producir un TCR, un polipéptido o una proteína que sean recombinantes, es preferible que la célula hospedadora sea una célula de mamífero. Lo más preferible es que la célula hospedadora sea una célula humana. Si bien la célula hospedadora puede ser una célula de cualquier tipo, procedente de cualquier tipo de tejido y perteneciente a cualquier estadio del desarrollo, es preferible que sea un leucocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononucleada de sangre periférica (PBMC). Más preferentemente aún es que la célula hospedadora sea un linfocito T. El linfocito T puede ser cualquier linfocito T, como un linfocito T cultivado, p. ej., un linfocito T primario, o un linfocito T procedente de una estirpe cultivada de linfocitos T, como, p. ej., Jurkat, SupT1, etc., o bien un linfocito T obtenido de un mamífero, preferentemente un linfocito T o un precursor de linfocito T extraído a un paciente humano. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T puede proceder de numerosas fuentes, tales como sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o líquidos corporales, sin limitación. Los linfocitos T también se pueden enriquecer o purificar. Preferentemente, el linfocito T es un linfocito T humano. Más preferentemente aún, el linfocito T es un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede pertenecer a cualquier estadio del desarrollo, incluidos entre otros, un linfocito T CD4-positivo y/o CD8-positivo, linfocitos T cooperadores CD4-positivos, como, p. ej., linfocitos Th1 y Th2, linfocitos T CD8-positivos (p. ej., linfocitos T citotóxicos), células infiltradas en tumores (TIL), linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes, y similares. Preferentemente, el linfocito T es un linfocito T CD8-positivo o un linfocito T CD4-positivo.

Preferentemente, la célula hospedadora de la invención es un linfocito, preferiblemente un linfocito T, como un linfocito T CD4-positivo o un linfocito T CD8-positivo. Aún más preferentemente, la célula hospedadora es un linfocito T oncorreactivo que actúa específicamente contra las células tumorales que expresan TAA.

El objetivo de la invención también se resuelve con un método de fabricación de un constructo reconocedor de antígeno específico del TAA, o de una estirpe celular que exprese el constructo reconocedor de antígeno específico del TAA, el cual comprende:

- a. Proporcionar una célula hospedadora adecuada
- b. Proporcionar un constructo genético que comprende una secuencia codificante que codifica un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención dada a conocer en la presente memoria
- c. Introducir en la citada célula hospedadora adecuada el citado constructo genético, y
- d. La expresión del citado constructo genético por la citada célula hospedadora adecuada

El método puede comprender, además, un paso de presentación del citado constructo reconocedor de antígeno en la superficie de la citada célula hospedadora adecuada.

En otras formas de realización preferidas, el constructo genético es un constructo de expresión que comprende una secuencia promotora enlazada funcionalmente con dicha secuencia codificante.

Preferentemente, dicho constructo reconocedor de antígeno procede de un mamífero, y preferiblemente es de origen humano. La célula hospedadora adecuada que se prefiere para el uso en el método de la invención es una célula de mamífero, como una célula humana, en particular un linfocito T humano. Los linfocitos T para el uso en la invención ya han sido descritos pormenorizadamente en la presente memoria.

La invención también abarca formas de realización en las que dicho constructo reconocedor de antígeno es un TCR modificado, y en la que dicha modificación consiste en la adición de dominios funcionales, como un marcador o un principio activo terapéutico. Asimismo, abarca TCR provistos de dominios alternativos, como un dominio de anclaje a membrana alternativo en lugar de la región transmembrana endógena. Asimismo, abarca TCR provistos de mutaciones puntuales en el dominio variable o en el dominio constante del TCR con el fin de mejorar la expresión o la estabilidad del TCR y/o el emparejamiento de las cadenas que lo conforman.

Es conveniente que el sistema de transfección destinado a introducir el constructo genético en la citada célula hospedadora adecuada sea un sistema basado en un

vector retroviral. Tales sistemas son bien conocidos por las personas versadas en la materia.

En una de sus formas de realización, la presente invención también comprende una etapa adicional del método que consiste en el aislamiento y la purificación del constructo reconocedor de antígeno a partir de la célula y, opcionalmente, en la reconstitución de los fragmentos traducidos de dicho constructo en un linfocito T.

En un aspecto alternativo de la invención, se provee un linfocito T obtenido o que puede ser obtenido mediante un método para la producción de un receptor de linfocito T (TCR), que es específico para células tumorales y que presenta una afinidad elevada, tal y como se ha descrito antes en la presente memoria. Tal linfocito T depende de la célula hospedadora usada en el método de la invención, por ejemplo, un linfocito T humano o no humano, pero preferentemente un TCR humano.

El término «aislado», tal y como se emplea en la presente memoria en el contexto de un polipéptido, como un constructo reconocedor de antígeno (un ejemplo del cual puede ser un anticuerpo), se refiere a un polipéptido que es purificado de otras proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, experimental o cualesquier otro. Un constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención puede ser un constructo, que se une a antígeno, recombinante, sintético o modificado (no natural). El término «aislado» tal y como se emplea en la presente memoria en el contexto de un ácido nucleico o de una célula se refiere o bien a un ácido nucleico o a una célula que es purificado/a de entre ADN, ARN, proteínas o polipéptidos o cualquier otro contaminante (como otras células) que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, experimental o cualesquier otro, o bien a un ácido nucleico recombinante, sintético o modificado (no natural). En este contexto, una proteína o polipéptido o un ácido nucleico que sea «recombinante» es todo aquel fabricado con técnicas recombinantes. Los métodos y las técnicas destinadas a la producción de ácidos nucleicos y proteínas recombinantes son bien conocidos en la materia.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a los constructos reconocedores de antígeno, los ácidos nucleicos, los vectores, las composiciones

farmacéuticas y/o la célula hospedadora que se exponen en la presente memoria destinados al uso en medicina. En una forma de realización preferida, el uso en medicina incluye el uso para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad tumoral, como una enfermedad tumoral benigna o maligna. La enfermedad tumoral es, por ejemplo, una enfermedad tumoral que se caracteriza por la expresión del TAA, en una célula cancerosa o tumoral de dicha enfermedad.

Con respecto a las susodichas aplicaciones médicas de los constructos reconocedores de antígeno y los otros materiales derivados de los mismos, pertenecientes al mismo o que codifiquen el mismo, en concordancia con la presente revelación, las enfermedades susceptibles de tratamiento o de diagnóstico pueden ser cualquier trastorno proliferativo, preferentemente caracterizado por la expresión del TAA o de la secuencia del epítipo del TAA de la invención, por ejemplo cualquier tipo de cáncer, incluidos cualquiera de los siguientes: cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer del ano, del canal anal o anorrectal, cáncer ocular, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, la cavidad nasal o del oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de rinofaringe, linfoma no hodgkiniano, cáncer bucofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de los tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. Tipos de cáncer preferidos son el cáncer de cuello uterino, bucofaríngeo, de ano, del canal anal, anorrectal, de vagina, vulva o pene. Un cáncer especialmente preferido es el cáncer positivo para TAA, incluido preferentemente el carcinoma ovárico, la leucemia o el melanoma.

Los constructos, proteínas, TCR, anticuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención están destinados en particular para el uso en inmunoterapia,

preferentemente en la terapia adoptiva de linfocitos T. La administración de los compuestos de la invención puede, por ejemplo, implicar la infusión de los linfocitos T de la invención en el paciente en cuestión. Preferiblemente, tales linfocitos T son linfocitos T autólogos del paciente que en condiciones *in vitro* se transducen con un ácido nucleico o con un constructo reconocedor de antígeno de la presente invención.

Los constructos reconocedores de antígeno, los TCR, polipéptidos, proteínas (incluidas las variantes funcionales de todos ellos), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluidas las fracciones de unión al antígeno de los mismos) que forman parte de la presente invención serán designados todos ellos de manera colectiva como «materiales del TCR de la invención» de aquí en adelante y podrán ser formulados en una composición, como una composición farmacéutica. A este respecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los constructos reconocedores de antígeno, los TCR, polipéptidos, proteínas, fracciones funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas) y los anticuerpos (incluidas las fracciones de unión al antígeno de los mismos) descritos en la presente memoria, así como un vehículo, excipiente y/o estabilizante aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Las composiciones farmacéuticas de la invención que contienen cualesquiera de los materiales de TCR de la invención pueden comprender más de un material de TCR de la invención, como, por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más TCR distintos (incluidas las fracciones funcionales y las variantes funcionales de los mismos). Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender un material de TCR de la invención en combinación con otros medicamentos o principios activos farmacéuticos, como antineoplásicos, p. ej., asparraginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. Preferentemente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el vehículo puede ser cualquiera de los usados habitualmente para el material de TCR de la presente invención en consideración. Tales vehículos farmacéuticos son bien conocidos por las personas versadas en la materia y están

públicamente disponibles. Es preferible que el vehículo farmacéutico no cause efectos secundarios perjudiciales ni toxicidad si se emplea siguiendo las condiciones de uso.

Así pues, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los productos de la invención y de materiales de TCR de la invención que se describen en la presente memoria, en concreto cualesquiera proteínas, ácidos nucleicos o células hospedadoras. En una forma de realización preferida la composición farmacéutica está destinada a servir como inmunoterapia, preferentemente la terapia adoptiva con células.

Preferentemente, el material de TCR de la invención se administra mediante inyección, por ejemplo, intravenosa. Cuando el material de TCR de la invención sea una célula hospedadora que exprese el TCR de la invención (o una variante funcional del mismo), el vehículo farmacéutico para las células que se administrarán mediante inyección puede incluir cualquier vehículo isotónico como, por ejemplo, solución salina normal (aprox. 0,90% p/v de NaCl en agua, aprox. 300 mOsm/l de NaCl en agua, o aprox. 9,0 g de NaCl por litro de agua), solución de electrolitos NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL, EE. UU.), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL, EE. UU.), o una solución de dextrosa de aprox. el 5% en agua, o solución de lactato (de Ringer). En una forma de realización, el vehículo farmacéutico se complementa con seroalbúmina humana.

A efectos de la invención, la cantidad o la dosis del material de TCR de la invención (p. ej., el número de células cuando el material de TCR de la invención sea una o más células) que se ha de administrar debe ser la suficiente para influir, p. ej., para generar una respuesta preventiva o terapéutica, en el sujeto o en el animal durante un plazo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de TCR de la invención debe bastar para unirse a un antígeno tumoral, o para detectar, tratar o prevenir el cáncer en un período comprendido aproximadamente entre las 2 horas o más, p. ej., 12 o 24 horas o más, desde el momento de la administración. En ciertas formas de realización, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis vendrá determinada por la eficacia del material de TCR de la invención en particular y del estado del animal o de la persona que va a ser tratada, así como de su peso corporal.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, los constructos reconocedores de antígeno, los TCR (incluidas las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras o poblaciones de células se puedan usar en métodos para tratar o prevenir el cáncer, o los estados precancerosos positivos para TAA. Se cree que los TCR de la invención (y las variantes funcionales de los mismos) se unen específicamente al TAA de la invención, de tal modo que cuando el TCR (o el polipéptido o la proteína de la invención relacionados y las variantes funcionales de los mismos) se expresa en una célula, como un linfocito T, es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra una célula diana que expresa el TAA de la invención, preferentemente de presentar péptidos del TAA a través del MHC I o II sobre la superficie de dicha célula diana. A este respecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, en particular el cáncer, en un mamífero, el cual comprende la administración al mamífero de cualquiera de las composiciones farmacéuticas, constructos reconocedores de antígeno, en particular los TCR (y las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas descritos en la presente memoria, cualquier ácido nucleico o vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifique alguno de los TCR (y variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas descritos en la presente memoria, o cualquier célula hospedadora o población de células que comprenda un ácido nucleico o vector recombinante, que codifique algunos de los constructos de la invención (y las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos o proteínas descritas en la presente memoria, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad en el mamífero, siendo preferentemente dicha enfermedad un cáncer, como un cáncer que exprese el TAA de la invención.

Algunos ejemplos de vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico o de diluyentes útiles para la presente invención son estabilizantes como SPGA, carbohidratos (sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa o dextrano, entre otros), proteínas como albúmina o caseína, agentes portadores de proteínas como suero bovino o leche descremada y tampones (tampón fosfato, por ejemplo).

A efectos de la presente memoria, los términos «tratar» y «prevenir» así como las palabras derivadas de los mismos, no implican necesariamente el tratamiento o la

prevención al 100% o en términos absolutos. Más bien existen diversos grados de tratamiento o de prevención de los que cualquier persona versada en la materia reconocerá como dotados de un posible efecto terapéutico o benéfico. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier grado de tratamiento o de prevención de una enfermedad en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método de la invención pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más enfermedades o síntomas de la enfermedad, p. ej., el cáncer, que está siendo tratada o prevenida. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención pueden incluir la promoción de la regresión de un tumor. Asimismo, a los efectos de la presente memoria, «prevención» puede abarcar el retraso en la aparición de la enfermedad, o de un síntoma o trastorno de la misma.

La presente invención se refiere, además, a un método para tratar el cáncer que comprende la administración de un TCR, un ácido nucleico o una célula hospedadora de la presente descripción en combinación con al menos un agente antineoplásico y/o radioterapia.

Otro aspecto de la invención concierne, además, a un método para detectar una proteína TAA, o un complejo formado por una molécula del MHC con la proteína TAA (epítipo proteico del TAA), en una muestra (biológica) –como la obtenida de un sujeto o paciente– que comprende la puesta en contacto de la muestra con un constructo reconocedor de antígeno que se une específicamente a dicho péptido TAA, o al complejo péptido TAA/MHC, y la detección de la unión entre dicho constructo reconocedor de antígeno y dicho péptido TAA, o dicho complejo de péptido TAA/MHC. En ciertas formas de realización, el constructo reconocedor de antígeno es un TCR o un anticuerpo, o constructos similares, o preferentemente el constructo reconocedor de antígeno acorde con la invención descrita en la presente memoria. En ciertas formas de realización, la muestra (biológica) es una muestra de un tumor o un cáncer (como cualquiera de los descritos a lo largo de la presente memoria), por ejemplo, una muestra que comprende células tumorales o cancerosas.

También se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita, el cual comprende:

- a) Aislamiento de una célula de dicho sujeto

- b) Transformación de la célula con al menos un vector que codifique un constructo reconocedor de antígeno de la presente invención para producir una célula transformada
- c) Expansión de la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) Administración de la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita, el cual comprende:

- a) Aislamiento de una célula procedente de un donante sano
- b) Transformación de la célula con un vector que codifique un constructo reconocedor de antígeno de la presente invención para producir una célula transformada
- c) Expansión de la célula transformada para producir una pluralidad de células transformadas; y
- d) Administración de la pluralidad de células transformadas a dicho sujeto.

También se proporciona un método para detectar el cáncer en una muestra biológica, el cual comprende:

- a) Puesta en contacto de la muestra biológica con un constructo reconocedor de antígeno de la presente descripción
- b) Detección de la unión del constructo reconocedor de antígeno a la muestra biológica.

En ciertas formas de realización, el método para la detección del cáncer se lleva a cabo en condiciones *in vitro*, *in vivo* o *in situ*.

Asimismo, se proporciona un método para detectar la presencia de una enfermedad en un mamífero. El método comprende: (I) La puesta en contacto de una muestra que comprenda una o más células del mamífero con cualquiera de los TCR (y las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos que forman parte de la invención, o bien de las composiciones farmacéuticas descritas aquí, de tal modo que formen un

complejo, y la detección de este complejo, siendo su detección indicadora de la presencia de la enfermedad en el mamífero, en la que la enfermedad es cáncer, tal como una neoplasia maligna positiva para TAA.

Con respecto al método de la invención para detectar una enfermedad en un mamífero, la muestra de células puede ser una muestra que contenga células enteras, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados de células enteras, como, p. ej., una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción consistente en proteínas enteras, o una fracción consistente en ácidos nucleicos.

A efectos del método de detección de la invención, el contacto puede tener lugar en condiciones *in vitro* o en condiciones *in vivo* en lo que concierne al mamífero. Preferentemente, la puesta en contacto será en condiciones *in vitro*.

Asimismo, la detección del complejo puede darse a través diversos modos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los constructos reconocedores de antígeno (y las variantes funcionales de los mismos), polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células o anticuerpos o TCR, o fracciones de unión al antígeno de los mismos que forman parte de la invención y que se describen en la presente memoria, pueden ser marcados con un marcador detectable como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína (FOTC), ficoeritrina (PE), etc.), una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, etc.), y partículas de elementos (partículas de oro, etc.).

A efectos de los métodos de la invención, en los que se administren células hospedadoras o poblaciones de células, las células pueden ser alogénicas o autólogas del mamífero en cuestión. Preferentemente, las células serán autólogas del mamífero.

Con respecto a las susodichas aplicaciones médicas del material de TCR de la invención, el cáncer susceptible de diagnóstico y/o de tratamiento puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de los siguientes: cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de

mama, cáncer del ano, del canal anal o anorrectal, cáncer ocular, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, la cavidad nasal o el oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mielode crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer rinofaríngeo, linfoma no hodgkiniano, cáncer bucofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de los tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. Tipos de cáncer preferidos son el cáncer de cuello uterino, bucofaríngeo, de ano, del canal anal, anorrectal, de vagina, vulva o pene. Un cáncer especialmente preferido es el cáncer positivo para TAA, como el cáncer que exprese PRAME, como por ejemplo el carcinoma ovárico, el melanoma o la leucemia.

En general, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto aquejado de un tumor o enfermedad tumoral que comprende la administración de los constructos reconocedores de antígeno, ácidos nucleicos, vectores, composiciones farmacéuticas y/o célula hospedadora que la presente invención da a conocer. Preferentemente el sujeto es un sujeto que precisa un tratamiento de esa naturaleza. En las formas de realización preferidas el sujeto es un mamífero, preferentemente un paciente humano, que está aquejado por un tumor o enfermedad tumoral, que es positiva para TAA.

A la vista de las descripciones dadas a conocer en la presente memoria se apreciará que la invención concierne, además, a los siguientes puntos:

Punto 1: Un constructo reconocedor de antígeno que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) 3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 129 y 135.

Punto 2: El constructo reconocedor de antígeno acorde con el punto 1, en que dicho constructo reconocedor de antígeno es capaz de unirse específica y/o selectivamente a un TAA del péptido antigénico de la invención.

Punto 3: El constructo reconocedor de antígeno acorde con el punto 1 ó 2, en que el constructo reconocedor de antígeno es un anticuerpo, o un derivado o fragmento del mismo, o un receptor de linfocito T (TCR), o un derivado o fragmento del mismo.

Punto 4: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 3, en que el citado constructo reconocedor de antígeno se une a un péptido antigénico TAA presentado por un antígeno leucocitario humano (HLA), y dicho HLA es opcionalmente del tipo A2.

Punto 5: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 4, en que el constructo se une específica y/o selectivamente a un epítopo provisto de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 97-115, preferentemente la SEQ ID N.º 97.

Punto 6: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 5, en que el constructo es un α/β -TCR, o un fragmento o derivado del mismo, o el constructo es un γ/δ -TCR, o un fragmento o derivado del mismo.

Punto 7: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 6, caracterizado porque dicho constructo es de origen humano y reconoce específica y/o selectivamente un péptido antigénico TAA.

Punto 8: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 7, en que dicho constructo reconocedor de antígeno es capaz de estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto, en que opcionalmente esa respuesta inmunitaria se caracteriza por un incremento de los niveles de interferón gamma (IFN- γ).

Punto 9: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 8, que comprende una cadena α o γ de TCR; y/o una cadena β o δ del TCR; en que la cadena α o γ del TCR comprende una CDR3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID N.º 3, 15, 27, 39, 51, 63, 75 y 129, y/o en que la cadena β o δ del TCR comprende una CDR3 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 9, 21, 33, 45, 57, 69, 81 y 135.

Punto 10: El constructo reconocedor de antígeno acorde con el punto 9, en que la cadena α o γ del TCR comprende, además, una CDR1 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 1, 13, 25, 37, 49, 61, 73 y 127; y/o una CDR2 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 2, 14, 26, 38, 50, 62, 74, 128, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202 y 204.

Punto 11: El constructo reconocedor de antígeno acorde con el punto 9 ó 10, en que la cadena β o δ del TCR comprende, además, una CDR1 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 7, 19, 31, 43, 55, 67, 79 y 133; y/o una CDR2 provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 8, 20, 32, 44, 56, 68, 80 y 134.

Punto 12: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 11, que comprende una región de cadena variable del TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 130 y 136.

Punto 13: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 12, en que el constructo está humanizado, quimerizado y/o murinizado.

Punto 14: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 13, que comprende un fragmento de unión de un TCR, en el que dicho fragmento de unión comprende las CDR1 a CDR3, opcionalmente seleccionadas entre las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1, 2, 3, 196; ó 7, 8, 9; ó 13, 14, 15, 197; ó 19, 20, 21; ó 25, 26, 27, 198; ó 31, 32, 33; ó 37, 38, 39, 199; ó 43, 44, 45; ó 49, 50, 51, 200; ó 55, 56, 57; ó 61, 62, 63, 201; ó 67, 68, 69; ó 73, 74, 75, 202; ó 79, 80, 81; ó 127, 128, 129, 204; ó 133, 134, 135.

Punto 15: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 14, en que el constructo es un TCR, o un fragmento del mismo, compuesto por al menos una secuencia de la cadena α de TCR y una secuencia de la cadena β de TCR, en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 1 a 3 y 196, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 7 a 9; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 13 a 15 y 197, y dicha secuencia de cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 19 a 21; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 25 a 27 y 198, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 31 a 33; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 37 a 39 y 199, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 43 a 45; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 49 a 51 y 200, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las

secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 55 a 57; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 61 a 63 y 201, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 67 a 69; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 73 a 75 y 202, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 79 a 81; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 127 a 129 y 204, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende las secuencias CDR1 a CDR3 provistas de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N.º 133 a 135.

Punto 16: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 15, en que el constructo es un TCR, o un fragmento del mismo, que comprende al menos una secuencia de la cadena α de TCR y una secuencia de la cadena β de TCR, en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 4, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 10; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 16, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 22; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 28, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 34; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 40, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 46; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 52, y en que dicha

secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 58; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 64, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 70; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 76, y en que dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 82; o en que dicha secuencia de la cadena α de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 130, y dicha secuencia de la cadena β de TCR comprende una secuencia de región variable provista de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 136.

Punto 17: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 16, en que el constructo es un TCR, o un fragmento del mismo, que además comprende una región de la cadena constante del TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 131 y 137, preferentemente en que el TCR está compuesto de al menos una secuencia de la cadena α de TCR y de una secuencia de la cadena β de TCR, en que la secuencia de dicha cadena α de TCR comprende una región constante provista de al menos una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 5, 17, 29, 41, 53, 65, 77 y 131; y en que la secuencia de la cadena β de TCR comprende una región constante provista de al menos una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID N.º 11, 23, 35, 47, 59, 71, 83 y 137.

Punto 18: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100%

con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 6, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 12.

Punto 19: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 18, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 24.

Punto 20a: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 30, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 36.

Punto 20b: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 42, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 48.

Punto 20c: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 54, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%,

70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 60.

Punto 20d: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 66, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 72.

Punto 20e: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 78, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 84.

Punto 20f: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 17, que comprende una primera cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 132, y una segunda cadena de TCR provista como mínimo de una identidad de secuencia del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 138.

Punto 21: Ácido nucleico que codifica un constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 20f.

Punto 22: Vector de expresión que comprende un ácido nucleico acorde con el punto 21.

Punto 23: Célula hospedadora que comprende un constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 20, un ácido nucleico acorde con el punto 21, o un vector acorde con el punto 22.

Punto 24: La célula hospedadora acorde con el punto 23, en que la célula es un linfocito, preferentemente un linfocito T o una célula progenitora de linfocitos T, y más preferentemente un linfocito T CD4 o CD8 positivo.

Punto 25: Composición farmacéutica que comprende el constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 20f, o el ácido nucleico acorde con el punto 21, o el vector acorde con el punto 22, o la célula hospedadora acorde con el punto 23 ó 24, y un vehículo, estabilizante y/o excipiente que sean farmacéuticamente aceptables.

Punto 26: El constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 20f, o el ácido nucleico acorde con el punto 21, o el vector acorde con el punto 22, o la célula hospedadora acorde con el punto 23 ó 24, o la composición farmacéutica acorde con el punto 25, para el uso en medicina.

Punto 27: El constructo reconocedor de antígeno, o el ácido nucleico, o el vector, o la célula hospedadora, o la composición farmacéutica, para el uso acorde con el punto 26, para el uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de una enfermedad proliferativa, en que la enfermedad comprende una enfermedad tumoral maligna o benigna.

Punto 28: El constructo reconocedor de antígeno, o el ácido nucleico, o el vector, o la célula hospedadora, o la composición farmacéutica, para el uso acorde con el punto 27, en que la enfermedad tumoral se caracteriza por la expresión de TAA en una célula tumoral de la enfermedad tumoral.

Punto 29: El constructo reconocedor de antígeno, o el ácido nucleico, o el vector, o la célula hospedadora, o la composición farmacéutica, para el uso acorde con cualquiera de los puntos 26 a 28, en que el uso en medicina consiste en el uso como inmunoterapia, el cual opcionalmente comprende una transferencia de células

adoptivas, en que la inmunoterapia comprende la terapia adoptiva con linfocitos T autólogos o heterólogos.

Punto 30: Método para producir una estirpe celular que exprese el constructo reconocedor de antígeno específico de TAA, el cual comprende:

- a. Proporcionar una célula hospedadora adecuada
- b. Proporcionar un constructo genético que comprenda una secuencia codificante que codifique el constructo reconocedor de antígeno acorde con cualquiera de los puntos 1 a 20f
- c. Introducir en dicha célula hospedadora adecuada dicho constructo genético
- d. La expresión del citado constructo genético por la citada célula hospedadora adecuada

Punto 31: El método acorde con el punto 30, que comprende, además, la presentación en la superficie celular de dicho constructo reconocedor de antígeno.

Punto 32: El método acorde con el punto 30 o 31, en que el constructo genético es un constructo de expresión que comprende una secuencia promotora enlazada funcionalmente con dicha secuencia codificante.

Punto 33: El método acorde con cualquiera de los puntos 30 a 32, en que dicho constructo reconocedor de antígeno es de origen mamífero, preferentemente de origen humano.

Punto 34: El método acorde con cualquiera de los puntos 30 a 33, en que dicha célula hospedadora adecuada es una célula de mamífero, opcionalmente seleccionada entre una célula humana o un linfocito T humano.

Punto 35: El método acorde con cualquiera de los puntos 30 a 34, en que dicho constructo reconocedor de antígeno es un TCR modificado, en que dicha modificación comprende la adición de un dominio funcional que comprende una etiqueta, o un dominio alternativo que comprende un dominio de anclaje a membrana.

Punto 36: El método acorde con el punto 35, en que dicho constructo reconocedor de antígeno es un TCR alfa/beta, un TCR gamma/delta, o un TCR monocatenario (TCRmc).

Punto 37: El método acorde con cualquiera de los puntos 30 a 36, en que dicho constructo reconocedor de antígeno se introduce en dicha célula hospedadora adecuada mediante transfección retroviral.

Punto 38: El método acorde con cualquiera de los puntos 30 a 37, que además comprende el aislamiento y la purificación del constructo reconocedor de antígeno a partir de la célula hospedadora adecuada y, opcionalmente, la reconstitución del constructo reconocedor de antígeno en un linfocito T.

A continuación, se pasará a describir con más detalle la presente invención mediante una serie de ejemplos en los que se aludirá a figuras y secuencias adjuntas que describen las formas de realización preferidas de los mismos, sin que con ello se pretenda limitar el alcance de la invención. A efectos de la presente invención, todas las referencias citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su integridad. Las figuras y secuencias exponen:

Figura 1: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R11P3D3 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de treonina o alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 115) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8⁺ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8⁺ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y las variantes con sustitución de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 2: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8 $^{+}$ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de treonina o alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8 $^{+}$ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8 $^{+}$ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y las variantes con sustitución de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 3: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8 $^{+}$ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1E8 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de treonina o alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8 $^{+}$ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8 $^{+}$ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y las variantes con sustitución de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 4: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8 $^{+}$ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1A9 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 106) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8 $^{+}$ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8 $^{+}$ solos sometidos a la

electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_IFN-040 y Ala_IFN-041).

Figura 5: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1D7 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de treonina o alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 115) o el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8⁺ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8⁺ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y las variantes con sustitución de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 6: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1G3 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de treonina o alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 115) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8⁺ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8⁺ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y las variantes con sustitución de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 7: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P2B6 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o diversas variantes con sustitución de treonina

o alanina de PRAME-004 en las posiciones 1 a 9 (X1-X9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98 a 115) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron varios donantes distintos en lo referente a las variantes con sustitución de alanina (Ala_TCRA-0017 y Ala_IFN-041) y las variantes con sustitución de treonina (Thr_TCRA-0036).

Figura 8: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R11P3D3 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-040 e IFN-041.

Figura 9: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados

conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-046 e IFN-041.

Figura 10: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1E8 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-040 e IFN-041.

Figura 11: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1A9 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-040 e IFN-041.

Figura 12: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1D7 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ

ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-040 e IFN-041.

Figura 13: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1G3 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-046 e IFN-041.

Figura 14: Secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P2B6 (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares pero no relacionados TMED9-001 (SEQ ID N.º 116), CAT-001 (SEQ ID N.º 117), DDX60L-001 (SEQ ID N.º 118), LRRC70-001 (SEQ ID N.º 119), PTPLB-001 (SEQ ID N.º 120), HDAC5-001 (SEQ ID N.º 121), VPS13B-002 (SEQ ID N.º 122), ZNF318-001 (SEQ ID N.º 123), CCDC51-001 (SEQ ID N.º 124) o IFIT1-001 (SEQ ID N.º 125) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes

de dos donantes sanos distintos. Como controles se emplearon linfocitos T CD8+ solos sometidos a la electroporación para introducir el ARN, o bien incubados conjuntamente con células diana no cargadas. Se analizaron donantes distintos: IFN-040 e IFN-041.

Figura 15: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R11P3D3 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) en presencia de diversas concentraciones de carga del péptido comprendidas entre 10 μ M y 10 pM. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Los donantes analizados fueron: TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 16: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) en presencia de diversas concentraciones de carga del péptido comprendidas entre 10 μ M y 10 pM. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Los donantes analizados fueron: TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 17: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1E8 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) en presencia de diversas concentraciones de carga del péptido comprendidas entre 10 μ M y 10 pM. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Los donantes analizados fueron: TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 18: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1D7 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) en presencia de diversas concentraciones de carga del péptido comprendidas entre 10 μ M y 10 pM. Los datos de liberación del IFN- γ se

obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Los donantes analizados fueron: TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 19: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P1G3 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) en presencia de diversas concentraciones de carga del péptido comprendidas entre 10 μ M y 10 pM. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Los donantes analizados fueron: TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 20: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ que habían sido sometidos a electroporación para introducir el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R17P2B6 (Tabla 1) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 (SEQ ID N.º 97) en presencia de diversas concentraciones de carga del péptido comprendidas entre 10 μ M y 10 pM. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos. Los donantes analizados fueron: TCRA-0003 y TCRA-0017.

Figura 21: Tinción con tetrámeros de HLA-A*02/PRAME-004 o con tetrámeros de HLA-A*02/NYESO1-001, respectivamente, de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN de las cadenas alfa y beta del TCR R16P1C10 (Tabla 1). Como controles se utilizaron linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación para introducir en ellos el ARN del TCR 1G4 (SEQ ID N.º 85 a 96), que se une específicamente al complejo de HLA-A*02/NYESO1-001, así como linfocitos T CD8+ sometidos a una electroporación ficticia.

Figura 22: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3 por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) (D103805 y D191451) o por parte de linfocitos no transducidos (D103805 NT y D191451 NT) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 100 nM (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares (idénticos a PRAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados ACPL-001 (SEQ ID N.º 139), HSPB3-001 (SEQ ID N.º 140), UNC7-001 (SEQ ID N.º 141), SCYL2-001 (SEQ ID N.º 142), RPS2P8-001

(SEQ ID N.º 143), PCNXL3-003 (SEQ ID N.º 144), AQP6-001 (SEQ ID N.º 145), PCNX-001 (SEQ ID N.º 146), AQP6-002 (SEQ ID N.º 147) TRGV10-001 (SEQ ID N.º 148), NECAP1-001 (SEQ ID N.º 149) o FBXW2-001 (SEQ ID N.º 150) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, D103805 y D191451.

Figura 23: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3 por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 100 nM (SED ID N.º 97) o con péptidos similares (idénticos a PRAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados (SED ID N.º 151-195) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, TCRA-0087 y TCRA-0088.

Figura 24: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3 por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) (D103805 y D191451) o por parte de linfocitos no transducidos (D103805 NT y D191451 NT) tras la incubación conjunta con distintas células primarias [HCASMC (miocitos lisos de las arterias coronarias), HTSMC (miocitos lisos de la tráquea), HRCEpC (células epiteliales de la corteza renal), HCM (cardiomiocitos), HCMEC (células del endotelio microvascular cardíaco), HSAEpC (células epiteliales de las vías aéreas de pequeño calibre), HCF (fibroblastos cardíacos)] y con tipos celulares derivados de iPSC [HN (neuronas), iHCM (cardiomiocitos), HH (hepatocitos) y HA (astrocitos)]. Las estirpes de células tumorales UACC-257 (expresión elevada de PRAME-004), Hs695T (expresión media de PRAME-004), U266B1 (expresión sumamente baja de PRAME-004) y MCF-7 (expresión nula de PRAME-004) presentan distinto número de copias de PRAME-004 por célula. Los linfocitos T solos actuaron como controles. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, D103805 y D191451.

Figura 25: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3 por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) tras la incubación conjunta con distintas células primarias [NHEK (queratinocitos epidérmicos), HBEpC (células

epiteliales de los bronquios), HDMEC (células del endotelio microvascular cutáneo), HCAEC (células endoteliales de las arterias coronarias), HAoEC (células endoteliales de la aorta), HPASMC (miocitos lisos de la arteria pulmonar), HAoSMC (miocitos lisos de la aorta), HPF (fibroblastos pulmonares), SkMC (miocitos esqueléticos), HOB (osteoblastos), HCH (condrocitos), HWP (preadipocitos uniloculares), hMSC-BM (células madre mesenquimáticas) y NHDF (fibroblastos dérmicos)]. Las estirpes de células tumorales UACC-257 (expresión elevada de PRAME-004), Hs695T (expresión media de PRAME-004), U266B1 (expresión sumamente baja de PRAME-004) y MCF-7 (expresión nula de PRAME-004) presentan distinto número de copias de PRAME-004 por célula. Los linfocitos T solos actuaron como controles. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, TCRA-0084 y TCRA-0085.

Figura 26: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3 por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) (D103805 y D191451) o por parte de linfocitos no transducidos (D103805 NT y D191451 NT) tras su incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 100 nM (SEQ ID N.º 97) o con los péptidos similares (idénticos a PRAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados ACPL-001 (SEQ ID N.º 139), HSPB3-001 (SEQ ID N.º 140), UNC7-001 (SEQ ID N.º 141), SCYL2-001 (SEQ ID N.º 142), RPS2P8-001 (SEQ ID N.º 143), PCNXL3-003 (SEQ ID N.º 144), AQP6-001 (SEQ ID N.º 145), PCNX-001 (SEQ ID N.º 146), AQP6-002 (SEQ ID N.º 147) TRGV10-001 (SEQ ID N.º 148), NECAP1-001 (SEQ ID N.º 149) o FBXW2-001 (SEQ ID N.º 150) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, D103805 y D191451.

Figura 27: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3_KE por medio de vectores lentivíricos (Tabla1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con el péptido PRAME-004 100 nM (SED ID N.º 97) o con los péptidos similares (idénticos a PRAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados (SED ID N.º 151-195) o con el péptido de control NYESO1-001 (SEQ ID N.º 126). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de

linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, TCRA-0087 y TCRA-0088.

Figura 28: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3_K3 por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) (D103805 y D191451) o por parte de linfocitos no transducidos (D103805 NT y D191451 NT) tras la incubación conjunta con distintas células primarias [HCASMC (miocitos lisos de las arterias coronarias), HTSMC (miocitos lisos de la tráquea), HRCEpC (células epiteliales de la corteza renal), HCM (cardiomiositos), HCMEC (células del endotelio microvascular cardíaco), HSAEpC (células epiteliales de las vías aéreas de pequeño calibre), HCF (fibroblastos cardíacos)] y con tipos celulares derivados de iPSC [HN (neuronas), iHCM (cardiomiositos), HH (hepatocitos) y HA (astrocitos)]. Las estirpes de células tumorales UACC-257 (expresión elevada de PRAME-004), Hs695T (expresión media de PRAME-004), U266B1 (expresión sumamente baja de PRAME-004) y MCF-7 (expresión nula de PRAME-004) presentan distinto número de copias de PRAME-004 por célula. Los linfocitos T solos actuaron como controles. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, D103805 y D191451.

Figura 29: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3_KE por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) tras la incubación conjunta con distintas células primarias [NHEK (queratinocitos epidérmicos), HBEpC (células epiteliales de los bronquios), HDMEC (células del endotelio microvascular cutáneo), HCAEC (células endoteliales de las arterias coronarias), HAoEC (células endoteliales de la aorta), HPASMC (miocitos lisos de la arteria pulmonar), HAoSMC (miocitos lisos de la aorta), HPF (fibroblastos pulmonares), SkMC (miocitos esqueléticos), HOB (osteoblastos), HCH (condrocitos), HWP (preadipocitos uniloculares), hMSC-BM (células madre mesenquimáticas), NHDF (fibroblastos dérmicos)]. Las estirpes de células tumorales UACC-257 (expresión elevada de PRAME-004), Hs695T (expresión media de PRAME-004), U266B1 (expresión sumamente baja de PRAME-004) y MCF-7 (expresión nula de PRAME-004) presentan distinto número de copias de PRAME-004 por célula. Los linfocitos T solos actuaron como controles. Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron

de linfocitos T CD8+ procedentes de dos donantes sanos distintos, TCRA-0084 y TCRA-0085.

Figura 30: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR R11P3D3 o con el TCR mejorado R11P3D3_KE por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) o por parte de linfocitos no transducidos tras la incubación conjunta con las estirpes de células tumorales UACC-257 (expresión elevada de PRAME-004), Hs695T (expresión media de PRAME-004), U266B1 (expresión sumamente baja de PRAME-004) y MCF-7 (expresión nula de PRAME-004) que presentan distinto número de copias de PRAME-004 por célula. Los linfocitos T solos actuaron como controles. La liberación de IFN- γ con ambos TCR aparece correlacionada con la presentación del PRAME-004 y el R11P3D3_KE propicia respuestas más acusadas que el R11P3D3.

Figura 31: Secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8+ transducidos con el TCR mejorado R11P3D3_KE por medio de vectores lentivíricos (Tabla 1) tras la incubación conjunta con células diana T2 cargadas con diversas variantes del PRAME-004 con sustitución de alanina en las posiciones 1-9 (A1-A9) de la SEQ ID N.º 97 (SEQ ID N.º 98-106). Los datos de liberación del IFN- γ se obtuvieron de linfocitos T CD8+ procedentes de tres donantes sanos distintos.

Figura 32: Valoración de la potencia de la actividad citolítica contra células tumorales PRAME-004+ manifestada por linfocitos T que habían sido sometidos a transducción lentivírica para que expresaran el R11P3D3 o el TCR mejorado R11P3D3_KE. La respuesta citotóxica de los linfocitos T transducidos con R11P3D3 y con R11P3D3_KE y no transducidos (NT) se midió empleando células tumorales A-375 (expresión baja de PRAME-004) o U2OS (expresión media de PRAME-004). Las valoraciones se efectuaron con un ensayo de citotoxicidad por microscopía de fluorescencia de 72 horas. Los resultados se expresan en forma de crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

Tabla 1: Secuencias de los TCR de la invención

SEQ ID N.º	TCR	Cadena	Región	Secuencia
1	R11P3D3	alfa	CDR1	SSNFYA
2	R11P3D3	alfa	CDR2	MTL
3	R11P3D3	alfa	CDR3	CALYNNNDMRF
4	R11P3D3	alfa	dominio variable	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSN FYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKG SQPEDSATYLCALYNNNDMRF GAGTRLTVKP
5	R11P3D3	alfa	dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSA VAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLV EKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
6	R11P3D3	alfa	entera	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSN FYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKG SQPEDSATYLCALYNNNDMRF GAGTRLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSN KSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIG FRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
7	R11P3D3	beta	CDR1	SGHNS
8	R11P3D3	beta	CDR2	FNNNVP
9	R11P3D3	beta	CDR3	CASSPGSTDTQYF
10	R11P3D3	beta	dominio variable	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNS LFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQP SEPRDSAVYFCASSPGSTDTQYFGPGTRLTVL

11	R11P3D3	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
12	R11P3D3	beta	entera	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNS LFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQP SEPRDSAVYFCASSPGSTDTQYFGPGTRLT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SAL VLMAMVKRKDSRG
13	R16P1C10	alfa	CDR1	DRGSQS
14	R16P1C10	alfa	CDR2	IY
15	R16P1C10	alfa	CDR3	CAAVISNFGNEKLTF
16	R16P1C10	alfa	dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRD SQPSDSATYLCAAVISNFGNEKLTFGTGTRLT IIP
17	R16P1C10	alfa	dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
18	R16P1C10	alfa	entera	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRD SQPSDSATYLCAAVISNFGNEKLTFGTGTRLT IIPNIQNPDPAVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVI GFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
19	R16P1C10	beta	CDR1	SGHRS

20	R16P1C10	beta	CDR2	YFSETQ
21	R16P1C10	beta	CDR3	CASSPWDSPNEQYF
22	R16P1C10	beta	dominio variable	MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHR VSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNV TLELGDSALYLCASSPWDSPNEQYFGPGTRLTVT
23	R16P1C10	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG
24	R16P1C10	beta	entera	MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHR VSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNV TLELGDSALYLCASSPWDSPNEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
25	R16P1E8	alfa	CDR1	NSAFQY
26	R16P1E8	alfa	CDR2	TY
27	R16P1E8	alfa	CDR3	CAMSEAAGNKLTF
28	R16P1E8	alfa	dominio variable	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSN SAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIR DSQPSDSATYLCAMSEAAGNKLTFGGGTRVLVKP
29	R16P1E8	alfa	dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS

30	R16P1E8	alfa	entera	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSN SAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIR DSQPSDSATYLCAMSEAAGNKLTFGGGTRVLVKPNIQNPDPNAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
31	R16P1E8	beta	CDR1	SGHAT
32	R16P1E8	beta	CDR2	FQNNGV
33	R16P1E8	beta	CDR3	CASSYTNQGEAFF
34	R16P1E8	beta	dominio variable	MGTRLLCWAALCCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATL YWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPA KLEDNAVYLCASSYTNQGEAFFGQGTRLTVV
35	R16P1E8	beta	dominio constante	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVQTIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF
36	R16P1E8	beta	entera	MGTRLLCWAALCCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATL YWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPA KLEDNAVYLCASSYTNQGEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV QTIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALV MAMVKRKDF
37	R17P1A9	alfa	CDR1	DRGSQS
38	R17P1A9	alfa	CDR2	IY
39	R17P1A9	alfa	CDR3	CAVLNQAGTALIF

40	R17P1A9	alfa	dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRD SQPSDSATYLCVNLNQAAGTALIFGKGTTLVSS
41	R17P1A9	alfa	dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
42	R17P1A9	alfa	entera	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRD SQPSDSATYLCVNLNQAAGTALIFGKGTTLVSSNIQNPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
43	R17P1A9	beta	CDR1	SGDLS
44	R17P1A9	beta	CDR2	YYNGEE
45	R17P1A9	beta	CDR3	CASSAETGPWLGNEQFF
46	R17P1A9	beta	dominio variable	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLS VYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSL ELGDSALYFCASSAETGPWLGNEQFFGPGTRTLTVL
47	R17P1A9	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG
48	R17P1A9	beta	entera	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLS VYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSL ELGDSALYFCASSAETGPWLGNEQFFGPGTRTLTVLEDLKNVFPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD

				RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKKRDSRG
49	R17P1D7	alfa	CDR1	TSESDYY
50	R17P1D7	alfa	CDR2	QEAY
51	R17P1D7	alfa	CDR3	CAYRWAQGGSEKLVF
52	R17P1D7	alfa	dominio variable	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCITYDTSES DYLLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKIS DSQLGDAAMYFCAYRWAQGGSEKLVFGKGTKLTVNP
53	R17P1D7	alfa	dominio constante	YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE KSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
54	R17P1D7	alfa	entera	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCITYDTSES DYLLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKIS DSQLGDAAMYFCAYRWAQGGSEKLVFGKGTKLTVNPYIQKPDPAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
55	R17P1D7	beta	CDR1	MGHDK
56	R17P1D7	beta	CDR2	SYGVNS
57	R17P1D7	beta	CDR3	CATELWSSGGTGELFF
58	R17P1D7	beta	dominio variable	MTIRLLCYMGFYFLGAGLMEADYQTPRYLVIGTGKKITLECSQTMGHDKM YWYQQDPGMELHLIHYSYGVNSTEKGDLSSSESTVSRIRTEHFPLTLESAR PSHTSQYLCATELWSSGGTGELFFGEGSRLTVL

59	R17P1D7	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSA LVLMMAMVKRKDSRG
60	R17P1D7	beta	entera	MTIRLLCYMGFYFLGAGLMEADYQTPRYLVIGTGKKITLECSQTMGHDKM YWYQQDPGMELHLIHYSYGVNSTEKGDLSSSESTVSRIRTEHFPLTLESAR PSHTSQYLCATELWSSGGTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA LVLMMAMVKRKDSRG
61	R17P1G3	alfa	CDR1	DRGSQS
62	R17P1G3	alfa	CDR2	IY
63	R17P1G3	alfa	CDR3	CAVGPSGTYYKIF
64	R17P1G3	alfa	dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRD SQPSDSATYLCAVGPSGTYYKIFGTGTRLKVL
65	R17P1G3	alfa	dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
66	R17P1G3	alfa	entera	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRD SQPSDSATYLCAVGPSGTYYKIFGTGTRLKVL ANIQNPDP AVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNL SVI GFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
67	R17P1G3	beta	CDR1	MNHEY

68	R17P1G3	beta	CDR2	SMNVEV
69	R17P1G3	beta	CDR3	CASSPGGSGNEQFF
70	R17P1G3	beta	dominio variable	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEY MSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSKEKRNFLILES PSPNQTSLYFCASSPGGSGNEQFFGPGTRLTVL
71	R17P1G3	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKRKDSRG
72	R17P1G3	beta	entera	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEY MSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSKEKRNFLILES PSPNQTSLYFCASSPGGSGNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP EAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA LVLMAMVKRKDSRG
73	R17P2B6	alfa	CDR1	DRGSQS
74	R17P2B6	alfa	CDR2	IY
75	R17P2B6	alfa	CDR3	CAVVSGGGADGLTF
76	R17P2B6	alfa	dominio variable	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYS DRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSL LIRD SQPSDSATYLCVVSGGGADGLTFGKGTHLIQ
77	R17P2B6	alfa	dominio constante	YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDK TVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVE KSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

78	R17P2B6	alfa	entera	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDR GSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRD SQPSDSATYLCVVSGGGADGLTFGKGTHLIQPYIQKPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLS VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
79	R17P2B6	beta	CDR1	PRHDT
80	R17P2B6	beta	CDR2	FYEKMQ
81	R17P2B6	beta	CDR3	CASSLGRGGQPQH
82	R17P2B6	beta	dominio variable	MLSPDLPDASAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHLIKEKRETATLK CYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEQMQSDKGSIPDRFSAQQFSD YHSELNMSSLELGDSALYFCASSLGRGGQPQHFGDGTRLSIL
83	R17P2B6	beta	dominio constante	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF
84	R17P2B6	beta	entera	MLSPDLPDASAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHLIKEKRETATLK CYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEQMQSDKGSIPDRFSAQQFSD YHSELNMSSLELGDSALYFCASSLGRGGQPQHFGDGTRLSILEDLNKFVP PEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSEN EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVLSALVLMAMVKRKDF
85	1G4	alfa	CDR1	DSAIYN
86	1G4	alfa	CDR2	IQS
87	1G4	alfa	CDR3	CAVRPTSGGSYIPTF

88	1G4	alfa	dominio variable	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHP
89	1G4	alfa	dominio constante	YIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSN SAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLV EKSFETDTNLN FQNLSVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSS
90	1G4	alfa	entera	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLN FQNLSVIGF RILLK VAGFNLLMTLRLWSS
91	1G4	beta	CDR1	MNHEY
92	1G4	beta	CDR2	SVGAGI
93	1G4	beta	CDR3	CASSYVGNTGELFF
94	1G4	beta	dominio variable	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLL SAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVL
95	1G4	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

96	1G4	beta	entera	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLL SAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDSRG
127	R11P3D3_KE	alfa	CDR1	SSNFYA
128	R11P3D3_KE	alfa	CDR2	MTL
129	R11P3D3_KE	alfa	CDR3	CALYNNNDMRF
130	R11P3D3_KE	alfa	dominio variable	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSN FYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGS QPEDSATYLCALYNNNDMRFGAGTRLTVKP
131	R11P3D3_KE	alfa	dominio constante	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
132	R11P3D3_KE	alfa	entera	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFPSSN FYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGS QPEDSATYLCALYNNNDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLV EKSFETDTNLFQNLVIGF RILLKVAGFNLLMTLRLWSS
133	R11P3D3_KE	beta	CDR1	SGHNS
134	R11P3D3_KE	beta	CDR2	FNNNVP
135	R11P3D3_KE	beta	CDR3	CASSPGSTDTQYF

136	R11P3D3_KE	beta	dominio variable	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNS LFWYRETMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQP SEPRDSAVYFCASSPGSTDTQYFGPGTRLTVL
137	R11P3D3_KE	beta	dominio constante	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG
138	R11P3D3_KE	beta	entera	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNS LFWYRETMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQP SEPRDSAVYFCASSPGSTDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVLSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSAL
196	R11P3D3	alfa	CDR2bis	MTLNGDE
197	R16P1C10	alfa	CDR2bis	IYSNGD
198	R16P1E8	alfa	CDR2bis	TYSSGN
199	R17P1A9	alfa	CDR2bis	IYSNGD
200	R17P1D7	alfa	CDR2bis	QEAYKQQ
201	R17P1G3	alfa	CDR2bis	IYSNGD
202	R17P2B6	alfa	CDR2bis	IYSNGD
203	1G4	alfa	CDR2bis	IQSSQRE
204	R11P3D3_KE	alfa	CDR2bis	MTLNGDE

Tabla 2: Secuencias de péptidos de la invención

Código del péptido	Secuencia	SEQ ID N.º
PRAME-004	SLLQHLIGL	97
PRAME-004_A1	ALLQHLIGL	98
PRAME-004_A2	SALQHLIGL	99
PRAME-004_A3	SLAQHLIGL	100
PRAME-004_A4	SLLAHLIGL	101
PRAME-004_A5	SLLQALIGL	102
PRAME-004_A6	SLLQHAIGL	103
PRAME-004_A7	SLLQHLAGL	104
PRAME-004_A8	SLLQHIAL	105
PRAME-004_A9	SLLQHLIGA	106
PRAME-004_T1	TLLQHLIGL	107
PRAME-004_T2	STLQHLIGL	108
PRAME-004_T3	SLTQHLIGL	109
PRAME-004_T4	SLLTHLIGL	110
PRAME-004_T5	SLLQTLIGL	111
PRAME-004_T6	SLLQHTIGL	112
PRAME-004_T7	SLLQHLTGL	113
PRAME-004_T8	SLLQHLITL	114
PRAME-004_T9	SLLQHLIGHT	115
TMED9-001	SILQTLILV	116
CAT-001	SLIEHLQGL	117
DDX60L-001	SLIQHLEEI	118
LRRC70-001	SLLKNLIYL	119
PTPLB-001	SLLNHLPYL	120
HDAC5-001	SLLQHVLLL	121
VPS13B-002	SLLQKQIML	122
ZNF318-001	SLSQELVGV	123
CCDC51-001	SVLGALIGV	124
IFIT1-001	VLLHHQIGL	125
NYESO1-001	SLLMWITQV	126

ACPL-001	LLLVHLIPV	139
HSPB3-001	IILRHLEI	140
UNC7-001	KILLHLIHI	141
SCYL2-001	KVLPHLIPL	142
RPS2P8-001	SALVHLIPV	143
PCNXL3-003	NALVHLIEV	144
AQP6-001	VALGHLIGI	145
PCNX-001	NALVHLIEI	146
AQP6-002	WALGHLIGI	147
TRGV10-001	QALEHLIYI	148
NECAP1-001	ISLAHLILV	149
FBXW2-001	ETLDHLISL	150
ACCSL-001	ALLSHLICR	151
ACER1-001	KELRHLEIV	152
ADAMTS14-001	IALVHLIMV	153
ARHGAP17-001	CWLCHLIKL	154
ARSE-001	GKLTHLIPV	155
ATP-009	HLLMHLIGS	156
AUNI-001	TQLDHLIPG	157
C16orf96-001	QDLWHLIKL	158
CDC7-002	IALKHLIPT	159
CDC7-003	IALKHLILT	160
CHRNA1-001	LQLIHLINV	161
FASTKD5-001	SQLVHLIYV	162
FRYL-002	CLLPHLIQH	163
FTH1-001	MVLVHLIHS	164
HERC4-002	SDLFHLIGV	165
HPS5-001	KLLFHLIQS	166
HPS5-002	KLLLHLIQS	167
HTR2C-001	SFLVHLIGL	168
IPM-001	YGLKHLISV	169
KIF16-001	SELPHLIGI	170
KLHL33-001	YALSHLIHA	171

LAMA3-001	TLLGHLISK	172
LOC100128170-001	SQLSHLIAM	173
MAP2K7-001	FFLVHLICM	174
MON2-003	VSLHHLINA	175
OR2AK2-001	IMLIHLIRL	176
OR2AK2-002	ITLIHLIRL	177
OR2B6-001	SELFHLIPL	178
OR2B6-002	SVLFHLIPL	179
OTUD7A-001	AQLAHLILS	180
OVOS2-001	FLLGHLIPR	181
PIGC-002	MLLGHLIFF	182
RAD54L2-003	VLLFHLIEE	183
RASEF-001	VFLRHLITL	184
RASGRF1-003	TLLDHLIFK	185
RPS2P20-001	SVLVHLIPA	186
SACS-001	AKLEHLIYL	187
SPATA31D5-001	SLLPHLILS	188
TPST2-001	SILGHLICS	189
TRGV10-002	QSLEHLIYI	190
UGP-001	YILNHLINP	191
USP51-001	YKLLHLIWI	192
ZNF423-002	KLLCHLIEH	193
ZNF584-001	ALLDHLITH	194
ZNF99-001	FMLSHLIQH	195

EJEMPLOS

Los siete TCR específicos de PRAME dirigidos contra el péptido PRAME-004 dado a conocer en la presente memoria (R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3 y R17P2B6, véase la Tabla 1), codificantes de las cadenas alfa y beta de TCR específicas de tumor, se aislaron y se amplificaron a partir de linfocitos T procedentes de donantes sanos. Las células procedentes de donantes sanos se estimularon *in vitro* mediante un método descrito previamente (Walter et al., 2003 J Immunol., Nov 15;171(10):4974-8) y las células diana específicas fueron células

seleccionadas una a una mediante multímeros de HLA-A*02 antes de ser destinadas al aislamiento de los TCR. Las secuencias de TCR se aislaron con la 5'-RACE mediante métodos ordinarios como los descritos, por ejemplo, en Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 4.^a edición, de Green y Sambrook. Las regiones variables de las cadenas alfa y beta de los TCR R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3 y R17P2B6 se secuenciaron y se clonaron para proseguir con la caracterización funcional.

R11P3D3, R16P1C10, R17P1D7 y R17P2B6 derivan de un donante negativo para HLA-A*02 (alorreactivo) y R16P1E8, R17P1A9 y R17P1G3 derivan de un donante positivo para HLA-A*02.

Además, en la presente memoria se da a conocer el TCR mutante R11P3D3_KE, una variante mejorada del R11P3D3. La variante mejorada del TCR R11P3D3_KE se modificó a partir del TCR original tal y como se describe en PCT/EP2017/081745, incorporada a la presente memoria como referencia, y en el ejemplo 8 que se expone a continuación, y la secuencia codificante se obtuvo mediante síntesis génica antes de la caracterización funcional del TCR.

Ejemplo 1: Receptor de linfocito T R11P3D3

El TCR R11P3D3 (SEQ ID N.º 1-12 y 96) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 8).

R11P3D3 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ cargadas, respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina o treonina (Figura 1) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 8). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo. El TCR R11P3D3 tiene una CE₅₀ de 0,74 nM (Figura 15) y una afinidad de unión (K_D) de 18–26 μ M hacia el PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97).

La reexpresión del R11P3D3 en linfocitos T CD8+ primarios humanos conduce al reconocimiento selectivo y la destrucción de las estirpes de células tumorales que

presentan el PRAME-004 asociado a moléculas HLA-A*02 (Figuras 24, 25, 30 y 32). El TCR R11P3D3 no responde a ninguno de los 25 tipos de células primarias o derivadas de iPSC sanas (Figuras 24 y 25) y su reactividad cruzada se analizó con otros 67 péptidos similares (de los cuales 57 eran idénticos a PRAME-004 en las posiciones 3, 5, 6 y 7) pero no relacionados en el contexto de las moléculas HLA-A*02 (Figuras 8, 22 y 23).

Ejemplo 2: Receptor de linfocito T R16P1C10

El TCR R16P1C10 (SEQ ID N.º 13-24 y 197) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 9).

El R16P1C10 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ y se unen a tetrámeros HLA-A*02 (Figura 21) cargadas, respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina o treonina (Figura 2) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 9). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo. El TCR R16P1C10 tiene una CE₅₀ de 9,6 nM (Figura 16).

Ejemplo 3: Receptor de linfocito T R16P1E8

El TCR R16P1E8 (SEQ ID N.º 25-36 y 198) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 10).

El R16P1E8 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ cargadas, respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina o treonina (Figura 3) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 10). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo. El TCR R16P1E8 tiene una CE₅₀ ~1 μ M (Figura 17).

Ejemplo 4: Receptor de linfocito T R17P1A9

El TCR R17P1A9 (SEQ ID N.º 37-48 y 199) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 11).

El R17P1A9 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+, cargadas respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina (Figura 4) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 11). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo.

Ejemplo 5: Receptor de linfocito T R17P1D7

El TCR R17P1D7 (SEQ ID N.º 49-60 y 200) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 12).

El R17P1D7 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ cargadas, respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina o treonina (Figura 5) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 12). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo. El TCR R17P1D7 tiene una CE_{50} de 1,83 nM (Figura 18).

Ejemplo 6: Receptor de linfocito T R17P1G3

El TCR R17P1G3 (SEQ ID N.º 61-72 y 201) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 13).

El R17P1G3 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ cargadas, respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina o treonina (Figura 6) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 13). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo. El TCR R17P1G3 tiene una CE_{50} de 8,63 nM (Figura 19).

Ejemplo 7: Receptor de linfocito T R17P2B6

El TCR R17P2B6 (SEQ ID N.º 73-84 y 202) está restringido al PRAME-004 presentado por HLA-A*02 (SEQ ID N.º 97) (véase la Figura 14).

El R17P2B6 reconoce específicamente a PRAME-004 puesto que los linfocitos T CD8+ primarios humanos que reexpresan dicho TCR segregan IFN- γ tras su incubación conjunta con células diana HLA-A*02+ cargadas, respectivamente, con el péptido PRAME-004 o con variantes de PRAME-004 provistas de sustituciones de alanina o treonina (Figura 7) o con diversos péptidos cuya secuencia muestra un alto grado de similitud con la de PRAME-004 (Figura 14). El péptido NYESO1-001 sirve como control negativo. El TCR R17P2B6 tiene una CE_{50} de 2,11 nM (Figura 20) y una afinidad de unión (K_D) de 13 μ M hacia el PRAME-004 presentado por HLA-A*02.

Ejemplo 8: Receptor de linfocito T mejorado R11P3D3_KE

Se presenta aquí como variante del R11P3D3, el TCR mutado R11P3D3_KE, que presenta un emparejamiento mejorado, cuyos dominios variables α y β , portadores naturales de α W44/ β Q44, han sido mutados a α K44/ β E44. La mutación doble se selecciona entre la lista presente en PCT/EP2017/081745, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Está específicamente diseñada para restaurar la interacción óptima y la complementariedad morfológica con la estructura del TCR.

En comparación con el TCR original R11P3D3, el TCR mejorado R11P3D3_KE muestra una sensibilidad superior a la hora de reconocer el PRAME-004. La respuesta hacia las estirpes de células tumorales que presentan el PRAME-004 es más potente con el TCR mejorado R11P3D3_KE que con el TCR original R11P3D3 (Figura 30). Además, la actividad citolítica derivada del R11P3D3_KE es más potente que la del R11P3D3 (Figura 32). La mejor respuesta funcional que se observa con el TCR mejorado R11P3D3_KE concuerda plenamente con la mayor afinidad de unión hacia el PRAME-004, que aparece descrita en el ejemplo 1 (R11P3D3, K_D = 18-26 μ M) y en el ejemplo 8 (R11P3D3_KE, K_D = 5,3 μ M).